

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510078

研究課題名(和文) 化学的ストレスによる細胞死に於ける亜鉛イオンの毒性科学的役割について

研究課題名(英文) toxicological role of Zn<sup>2+</sup> in cell death induced by chemical stress

研究代表者

小山 保夫 (OYAMA, Yasuo)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授

研究者番号：80214229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛イオン(Zn<sup>2+</sup>)の生理学・栄養学意義については十分な研究が行われている。しかし、毒性科学面での役割は解明されていない。本研究では各種の化学物質による細胞死にZn<sup>2+</sup>がどのように関与しているかを検討し、以下の成果を得た。1) 酸化ストレスを誘発する化学物質(主に過酸化水素)による細胞毒性はZn<sup>2+</sup>で増強し、細胞内Zn<sup>2+</sup>キレート剤で減弱した。細胞内Zn<sup>2+</sup>濃度を上昇させる化学物質は一般的に過酸化水素の細胞毒性を増強した。2) 化学物質による細胞内Zn<sup>2+</sup>濃度上昇は正常下では細胞内チオール量の増加を起し、細胞保護的に働いた。Zn<sup>2+</sup>には相反する作用が認められ、細胞毒性への関与を複雑にしている。

研究成果の概要(英文)：The toxicological role of Zn<sup>2+</sup> in cell death induced by chemical compounds was examined in this study. Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> potentiated the cytotoxicity of hydrogen peroxide while the chelator of intracellular Zn<sup>2+</sup> diminished it. This result suggests an involvement of Zn<sup>2+</sup> in the cell death induced by hydrogen peroxide. The chemical compounds that induced the increase in intracellular Zn<sup>2+</sup> concentration potentiated the cytotoxicity of hydrogen peroxide. However, the increase in intracellular Zn<sup>2+</sup> concentration by the chemical compounds elevated the cellular content of nonprotein thiols, cytoprotective substances. It is suggested that Zn<sup>2+</sup> exerts reciprocal actions, cytoprotective and cytotoxic, on the cell death under certain conditions.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：細胞毒性 亜鉛イオン

## 1. 研究開始当初の背景

生体や細胞機能における亜鉛の生理的役割 (Mason, 2006; Yamazaki et al., 2007) が発見される以前から、亜鉛を利用する疾病治療/発症・進行予防は広く行われている (Prasad et al., 1978)。現在では健康維持の目的で亜鉛サプリメントは広く利用されているが、亜鉛欠乏症と異なり、亜鉛過剰症については症状が重篤でないことで関心は低い。まして、亜鉛の影響で化学物質の毒性増強が起こる可能性を検討している報告はない。このような状況を考えると、条件次第では「亜鉛が多く化学物質の細胞毒性を増強させる」という「我々の研究業績」は興味深い。即ち、単独では無作用濃度の $Zn^{2+}$ が非イオン型界面活性剤やイミダゾール系化合物の細胞毒性を著明に増強させることを見出した。さらに、過酸化水素で酸化ストレスを負荷した細胞では $Zn^{2+}$ が細胞致死率を著明に上昇させることも明らかにした。これらの実験成績から、 $Zn^{2+}$ が化学物質 (環境汚染物質) の細胞毒性にも関与していると予想し、トリブチル錫とメチル水銀が細胞内 $Zn^{2+}$ 濃度を上昇させることを報告した。そこで、申請研究では、化学物質の細胞毒性への $Zn^{2+}$ の関与を明らかにする基礎・展開実験を行う。さらに、亜鉛を多く含む臓器の細胞で毒性が強く発現するかも検討する。亜鉛の生理的役割を考えると、研究の波及性・普遍性は高く、亜鉛の毒性科学的側面を明らかにすることで環境科学・基礎医学への学術的寄与は大きい。

## 2. 研究の目的

(1) 多くの化学物質の細胞毒性に活性酸素種が関係している。それらの酸化ストレスによる細胞死に於ける亜鉛の毒性科学的役割を明らかにする。現在、活性酸素種 (この実験では $H_2O_2$ ) の酸化ストレスによる細胞死に細胞内 $Zn^{2+}$ は促進的作用、カルシウムイオンフォア A23187 の細胞内 $Ca^{2+}$ 負荷ストレスによる細胞死に抑制的作用という実験成績を得ており、さらに細胞死メカニズム解析を進めている。上記のストレスによる細胞膜 $Zn^{2+}$ 透過および細胞内 $Zn^{2+}$ 遊離の変化のメカニズム解明現在、温度依存性 $Zn^{2+}$ 透過機構が細胞膜に存在すること、細胞内チオール量と細胞内 $Zn^{2+}$ 濃度変化に逆相関があることを明らかにしている (Hashimoto et al., Toxicology In Vitro 2009; Kawanai et al., Toxicology Letters 2009)。上記のストレスによる細胞内 $Zn^{2+}$ 動態変化および $Zn^{2+}$ による細胞毒性変化のメカニズム解明する。

(2) 特定化学物質の細胞毒性への細胞内 $Zn^{2+}$ の関与とメカニズムを明らかにする。環境汚染物質としての「特定化学物質」を中心に、それらの細胞毒性に細胞内 $Zn^{2+}$ が促進的あるいは抑制的に関与しているか。もし、関与しているならば、メカニズムを明らかにする。特定化学物質としての有機金属化合物、難分解性化学物質、また、日用品・医薬品に含まれる界面活性剤を検討対象として実験を行う。現在、有機金属化合物では methylmercury (Kawanai et al., Toxicology Letters 2009) と tri-n-butyltin (Oyama et al., Toxicology 2009)、界面活性剤で polysorbate 80 (Oyama et al., Toxicology In Vitro 2010) が細胞内 $Zn^{2+}$

濃度を上昇させることを報告している。また、アゾール系抗菌剤で imidazole 系化合物は細胞内  $Zn^{2+}$  濃度を上昇させるが、triazole 系化合物では影響がないことを見出している (Matsui et al., Toxicology 2008; Kinazaki et al., Toxicology In Vitro 2009)。

### 3. 研究の方法

以下の動物実験については徳島大学動物実験委員会から許可を得ている (許可番号 05279 番)。化学的ストレスに脆弱な細胞のラット胸腺細胞に各種化学物質 (研究成果参照) を作用させ、蛍光化学手法を用いて細胞内  $Zn^{2+}$  動態を含む細胞膜動態・細胞内イオン物質動態を測定し、化学物質の細胞毒性への  $Zn^{2+}$  の関与メカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

(1) 局所麻酔薬リドカインとテトラカインの細胞内  $Zn^{2+}$  レベルに対する影響について: 胸腺細胞でリドカインは細胞内  $Zn^{2+}$  レベルを上昇、テトラカインは低下させることを報告した。作用を神経細胞でも確認した。

(2) 酸化ストレスによる細胞内  $Zn^{2+}$  レベルの上昇と  $Zn^{2+}$  による細胞内非タンパクチオールレベルの上昇について: 過酸化水素あるいは NO により細胞内  $Zn^{2+}$  レベル上昇が起こることを確認した。その  $Zn^{2+}$  レベル上昇は細胞内非タンパクチオールレベルの上昇を引き起こす可能性を実証した。無機亜鉛、有機亜鉛のそれぞれの単独適用では細胞内  $Zn^{2+}$  レベルの上昇と細胞内非タンパクチオールレベルの上昇が起こる。

(3) 細胞内  $Zn^{2+}$  レベルの過剰な上昇と酸化ス

トレスに対する脆弱性亢進について: 細胞内  $Zn^{2+}$  レベルをジンクピリチオンなどで過剰に上昇させると、細胞が酸化ストレス (ここでは過酸化水素) に対する脆弱性を亢進させることを明らかにした。これは前項(2)と矛盾するような印象を与えるが、酸化ストレスと細胞内  $Zn^{2+}$  レベルのバランスにより相反する結果になる可能性がある。また、細胞内  $Zn^{2+}$  レベルを上昇させる環境汚染物質でも同様な作用が確認された。

(4) 細胞膜  $Zn^{2+}$  透過と化学物質またはイオンの作用について: 化学物質あるいは金属イオンの投与で細胞内  $Zn^{2+}$  レベルの低下が観察される場合は細胞膜  $Zn^{2+}$  透過抑制が考えられる。

(5) 有機  $Zn^{2+}$  キレート剤の二相性影響について: クリオキノールはアルツハイマー病治療薬の可能性が示唆されている。低濃度では細胞内  $Zn^{2+}$  レベル上昇、高濃度では低下を起こし、ベル型の用量・反応関係を示した。この細胞内  $Zn^{2+}$  レベルの変化に対応して、酸化ストレスに対する脆弱性・抵抗性を変化させた。

### 5. 主要な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連帯研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

(1) Eri Fukunaga, Yasuo Oyama, Effects of tetracaine and lidocaine on intracellular  $Zn^{2+}$  levels in rat neurons: Preliminary analysis with FluoZin-3 fluorescence, Natural Science Research, 査読有, Vol.28, No.1, pp.1-5, 2014. <http://web.ias.tokushima-u.ac.jp/bulle>

tin/nat/nat28-1-1.pdf

(2) Yukari Miura, Xiaohui Chen, Saki Yamada, Aya Sugihara, Molomjamts Enkhjargal, Yuanzhi Sun, Keiko Kuroda, Masaya Satoh, Yasuo Oyama, Triclocarban-induced change in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level in rat thymocytes: Cytometric analysis with Fluo-3 under  $\text{Zn}^{2+}$ -free conditions, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 査読有, Vol.37, No.2, pp.563-570, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.013>

01.013

(3) Tomohiro Oyama, Keisuke Oyama, Eri Fukunaga, Hitoshi Ishibashi, Yasuo Oyama, Clioquinol, a lipophilic  $\text{Zn}^{2+}$  chelator, augments and attenuates the cytotoxicity of  $\text{H}_2\text{O}_2$ : A bell-shaped response curve of the effects of the drug, *Toxicology Research*, 査読有, Vol.3, No.2, pp.110-117, 2014.

DOI: 10.1039/C3TX50097G

(4) Yuanzhi Sun, Molomjamts Enkhjargal, Aya Sugihara, Saki Yamada, Xiaohui Chen, Yukari Miura, Eri Fukunaga, Masaya Satoh, Yasuo Oyama, Effect of triclocarban on membrane potential of rat thymocytes: Assessment with bis-(1,3-dibutyl-barbituric acid) trimethine oxonol, *Natural Science Research*, 査読有, Vol.27, No.4, pp.51-57, 2013.

<http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repository/metadata/105960>

(5) Tsolmon Chimeddorj, Tomoko Suzuki,

Kazuhiro Murakane, Miyuki Inai, Masaya Satoh, Yasuo Oyama, Synergistic increase in cell lethality by dieldrin and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in rat thymocytes: Effect of dieldrin on the cells exposed to oxidative stress, *Chemosphere*, 査読有, Vol.93, No.2, pp.353-358, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.092>

(6) Eri Fukunaga, Yasuhiro Kanbara, Yumi Hirao, Yasuo Oyama, Role of  $\text{Zn}^{2+}$  in restoration of nonprotein thiol content in the cells under chemical stress induced by triclocarban, *Natural Science Research*, 査読有, Vol.27, No.1, pp.1-5, 2013.

<http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repository/metadata/104978>

(7) Yasuhiro Kanbara, Kazuhiro Murakane, Yumiko Nishimura, Masaya Satoh, Yasuo Oyama, Nanomolar concentration of triclocarban increases the vulnerability of rat thymocytes to oxidative stress, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有, Vol.38, No.1, pp.49-55, 2013.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/1/38.../\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/1/38.../_pdf)

(8) Junpei Morita, Aoi Teramachi, Yosuke Sanagawa, Saramaiti Toyson, Hiroshi Yamamoto, Yasuo Oyama, Elevation of intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  level by nanomolar concentrations of triclocarban in rat thymocytes, *Toxicology Letters*, 査読有, Vol.215, No.3, pp.208-213, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.201>

2. 10. 012

(9) Yusuke Takahashi, Kaori Kanemaru, Shoji Imai, Norikazu Miyoshi, Takuya Kawanai, Yasuo Oyama, Yttrium decreases the intracellular  $Zn^{2+}$  concentration in rat thymocytes by attenuating a temperature-sensitive  $Zn^{2+}$  influx, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 査読有, Vol. 34, No. 2, pp. 574-578, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.07.002>

07. 002

(10) Hakaru Seo, Ikuko Ogata-Ikeda, Shiro Ishida, Yoshiro Okano, Yasuo Oyama, A comparison of the cellular actions of polaprezinc (zinc-L-carnosine) and  $ZnCl_2$ , *Life Sciences*, 査読有, Vol. 90, No. 25-26, pp. 1015-1019, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.017>

05. 017

(11) Tomohiro Oyama, Shiro Ishida, Yoshiro Okano, Hakaru Seo, Yasuo Oyama, Clioquinol-induced increase and decrease in the intracellular  $Zn^{2+}$  level in rat thymocytes, *Life Sciences*, 査読有, Vol. 91, No. 23-24, pp. 1216-1220, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.09.014>

09. 014

(12) Yasuhiro Kanbara, Hakaru Seo, Yumiko Nishimura, Yasuo Oyama, Decrease in intracellular  $Zn^{2+}$  level by propranolol: A model experiment using rat thymocytes, *Natural Science Research*, 査読有, Vol. 26, No. 3, pp. 11-16, 2012.

<http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repos>

[itory/file/96890/20120620154747/LID201206201003.pdf](http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repository/file/96890/20120620154747/LID201206201003.pdf)

(13) Tomohiro Oyama, Minoru Saito, Takayasu Yonezawa, Okano Yoshiro, Yasuo Oyama, Nanomolar concentrations of zinc pyrithione increase cell susceptibility to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes, *Chemosphere*, 査読有, Vol. 87, No. 11, pp. 1316-1322, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.052>

01. 052

(14) Yumiko Nishimura, Yasuo Oyama, Further analysis on lidocaine-induced increase in intracellular  $Zn^{2+}$  concentration: Cytometric model study using FluoZin-3, 5-chloromethyl-fluorescein, and rat thymocytes, *Natural Science Research*, 査読有, Vol. 26, No. 2, pp. 7-10, 2012.

[http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repos](http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repository/file/96861/20120517114206/LID201205171003.pdf)

[itory/file/96861/20120517114206/LID201205171003.pdf](http://www.lib.tokushima-u.ac.jp/repository/file/96861/20120517114206/LID201205171003.pdf)

(15) Ikumi Tamura, Yasuhiro Kanbara, Minoru Saito, Kanna Horimono, Masaya Satoh, Hiroshi Yamamoto, Yasuo Oyama, Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular  $Zn^{2+}$  concentration in rat thymocytes: Its relation to oxidative stress, *Chemosphere*, 査読有, Vol. 86, No. 1, pp. 70-75, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.009>

09. 009

(16) Ikumi Tamura, Minoru Saito, Yumiko

Nishimura, Masaya Satoh, Hiroshi Yamamoto and Yasuo Oyama, Elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level by triclosan in rat thymic lymphocytes: Increase in membrane  $\text{Ca}^{2+}$  permeability and induction of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, Journal of Health Science, 査読有, Vol.57, No.6, pp.540-546, 2011.

[http://jhs.pharm.or.jp/data/57\(6\)/57\\_540.pdf](http://jhs.pharm.or.jp/data/57(6)/57_540.pdf)

(17) Takuya Kawanai, Masahiro Fujinaga, Kazuki Koizumi, Isao Kurotani, Erika Hashimoto, Masaya Satoh, Shoji Imai, Norikazu Miyoshi, Yasuo Oyama, Some characteristics of membrane  $\text{Cd}^{2+}$  transport in rat thymocytes: An analysis using Fluo-3, Biometals, 査読有, Vol.24, No.5, pp.903-914, 2011.

DOI: 10.1007/s10534-011-9444-3

(18) Yosuke Endo, Zhehao Han, Jun Kurochi, Masahiro Sakata, Akinori Maetaka, Takayasu Yonezawa, Kazuki Koizumi, Yasuo Oyama, Zinc-pyrithione exerts diverse actions on human leukemia K562 cells: A preliminary study on hormetic action, Natural Science Research, 査読有, Vol.25, No.3, pp.15-19, 2011.

<http://web.ias.tokushima-u.ac.jp/bulletin/nat/nat25-3-1.pdf>

(19) Akio Kinazaki, Hongqin Chen, Kazuki Koizumi, Takuya Kawanai, Tomohiro Oyama, Masaya Satoh, Shiro Ishida, Yoshiro Okano, Yasuo Oyama, Putative role of intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  release during oxidative stress: A trigger to restore

cellular thiol content that is decreased by oxidative stress, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, Vol.61, No.5, pp.403-409, 2011.

DOI: 10.1007/s12576-011-0160-0

(20) Kaori Kimura, Yumiko Nishimura, Keisuke Oyama, Takuya Kawanai, Erika Hashimoto, Yasuo Oyama, Tetracaine decreases intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  concentration by inhibiting  $\text{Zn}^{2+}$  influx in rat thymocytes, Natural Science Research, 査読有, Vol.25, No.2, pp.7-13, 2011.

<http://web.ias.tokushima-u.ac.jp/bulletin/nat/nat25-2-1.pdf>

(21) Soya Harada, Chiharu Kubota, Natsuhito Kitano, Takuya Kawanai, Kazuki Koizumi, Yasuo Oyama, Akio Kinazaki, Shiro Ishida and Yoshiro Okano : NOR-3, a donor of nitric oxide, increases intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  concentration and decreases cellular thiol content: A model experiment using rat thymocytes, FluoZin-3, and 5-chloromethylfluorescein, Natural Science Research, 査読有, Vol.25, No.1, pp.1-6, 2011.

<http://web.ias.tokushima-u.ac.jp/bulletin/nat/nat25-1-1.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 代表研究者

小山 保夫 (OYAMA, Yasuo)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授

研究者番号 : 8 0 2 1 4 2 2 9