

亜鉛ホメオスタシスの異常と神経細胞死

木 葉 敬 子, 定 金 豊, 川 原 正 博

(九州保健福祉大学薬学部薬学科分析学講座*)

Zinc homeostasis and neuronal death

Keiko KONOHA, Yutaka SADAKANE and Masahiro KAWAHARA

Department of Analytical Chemistry

School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare

1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka-city Miyazaki 882-8508, Japan

Abstract

Zinc is an essential trace element and crucial for the normal development of the central nervous system. Zinc is abundantly present in the brain and is secreted to synaptic clefts with neurotransmitters. However, its precise role is still under investigation. Meanwhile, excess zinc is reported to contribute to neuronal death in the global ischemia. We have investigated the effects of zinc in immortalized hypothalamic neurons (GT1-7 cells). Zinc chelator caused marked death of GT1-7 cells, while zinc itself caused degeneration of GT1-7 cells. Neurotoxicity of zinc was prevented by pyruvate and calcium. However, zinc inhibited death of GT1-7 cells induced by excessive extracellular calcium. Our results suggest that zinc homeostasis is important for neuronal survival and that calcium homeostasis is implicated in zinc-induced neurotoxicity.

Key words: apoptosis, zinc homeostasis, calcium homeostasis, cultured neuron

序 論

亜鉛 (Zn) は必須微量元素であり、多くの酵素・機能的蛋白質の構成要素として重要な役割を果たしている。Znは生体内に広く分布しているが、特に脳内含量は高く、中でも記憶・学習に重要な働きを持つ海馬や大脳皮質に高濃度で局在していることが知られている¹⁾。1960年代にPrasadによってZn欠乏が小人症を引き起こすことが報告され²⁾、Znはヒトに対しても必須元素であることが判明したが、その後の研究から、Zn欠乏は、身体の発達異常、免疫系の発達異常、味覚、嗅覚系の異常などを引き起こすことが判明している。また、乳幼児期におけるZnの欠乏は脳神経系の発達低下を引き起こすこと³⁾、成熟後も神経系における行動異常を引き起こすこと⁴⁾などが報告されており、Znは脳神経系においても重要な役割を果たしていると考えられる。脳内のZnは、一部は金属結合蛋白質や補酵素の構成成分として、蛋白質結合型として存在しているが、残りはイオン型として主に神経終末のシナプス小胞内に蓄えられ、神経細胞の興奮に伴って神経伝達物質と一緒にシナプス間隙に高濃度で放出される。シナプスにおけるZnは、神経系の機能発現や神経細胞の生存維持などに働いているのではないかと考えられてきたが、その詳細については未だ明らかではない。しかしながら、Znがグルタミン酸受容体やGABA受容体に作用することや、神経細胞の活動依存的に放出されたZnが近傍の神経回路のシナプス伝達調節に関わっていることが報告されており⁵⁾、神経情報のmodulatorとして作用している可能性が考えられている。さらに、Znは様々な神経疾患に関与する可能性も示唆されている。Kohらは、脳虚血時の神経細胞興奮に伴い細胞外に放出された過剰なZnが神経細胞死を引き起こすことを報告している⁶⁾。Znが培養神経細胞

*所在地：宮崎県延岡市吉野町1714-1 (〒882-8508)

の細胞死を引き起こすという多くの報告があり⁷⁻¹⁰⁾, また Hellmich らは, 虚血後のラット脳内に Zn キレーターを投与することによって神経細胞の脱落が阻害されることを報告している¹¹⁾。これらの研究結果から, Zn ホメオスタシスの異常が虚血に伴う遅延性神経細胞死を促進し, 最終的には脳血管性痴呆を引き起こす可能性が示唆されている。

一方, 老年性痴呆の大部分を占めるアルツハイマー病は, 老人斑の構成成分である β アミロイド蛋白の高次構造変化 (β シート構造形成) と, それによって増強される神経毒性とが発症に重要な役割を果たすと考えられている¹²⁾。 β アミロイド蛋白質の前駆体蛋白 (APP: amyloid precursor protein) は Cu, Zn 結合能を持つ金属結合蛋白であり¹³⁾, Bush らは, Zn が β アミロイド蛋白と結合して, その高次構造変化を促進させることを報告している¹⁴⁾。これは Zn がアルツハイマー病発症に関して促進的に働くことを示唆する結果である。しかしながら, 我々および他の研究から, Zn が β アミロイド蛋白によって形成された pore 構造に結合し, これによって引き起こされる Ca ホメオスタシス異常を阻害することによって β アミロイド蛋白の毒性作用を阻害することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。従って, Zn は脳血管性痴呆とアルツハイマー病という, 2つの主要な老年性痴呆において, 保護作用と毒性作用とを併せ持った複雑かつ重要な働きを持っていることが考えられる。

我々は, このような複雑な Zn による神経系への作用を解明するために, 培養神経細胞系を用いて検討を試みた。既に, 我々は Zn が視床下部神経細胞由来の細胞株である GT1-7 細胞に対して強い毒性を発揮することを見いだしている¹⁸⁾。 GT1-7 細胞は, 簡便に増殖させることが可能であり, 無血清条件下で分化し, 神経突起の伸展, 神経特異的蛋白質の発現, GnRH の分泌などの神経細胞特異的な性質を保持している¹⁹⁾。そこで, GT1-7 細胞に対して, Zn キレーターおよび Zn を投与し, その細胞生存率の変化を WST-1 法を用いて定量的に観察するとともに, 様々な薬物や金属を前投与し, Zn による GT1-7 細胞の神経細胞死を阻害する物質の探索を行って, その詳しいメカニズム解明を試みた。

キーワード: アポトーシス, 亜鉛ホメオスタシス, カルシウムホメオスタシス, 培養神経細胞

実験方法

1. 試薬

Zinc chloride (ZnCl_2), sodium pyruvate, uridine, γ -aminobutylic acid (GABA), deferoxamine (DFO), *o*-phenanthroline (PHE), clioquinol (CLQ), N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) は Sigma-Aldrich 社より, L-glutamic acid, taurine は (株)和光純薬工業より購入し, 10 mM の水溶液を作成して, 以後の実験に用いた。

2. 細胞培養

マウス不死化視床下部神経細胞 (GT1-7 細胞) は, 10% ウシ胎仔血清 (Invitrogen Corp.) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/Ham's F-12) 培地 (Sigma-Aldrich) を用い, 37°C, 7% CO_2 条件下で培養した。細胞が confluent になった後, trypsin-EDTA により細胞を dissociate し, 無血清 DMEM に suspend し, 96 穴マイクロプレートに 3×10^5 cell/cm² の濃度で播き, CO_2 インキュベーター内で 1~2 日間, 培養を行った。

3. 細胞生存率の測定

培養 1 日後, GT1-7 細胞に ZnCl_2 水溶液を投与し, 24 時間後に細胞生存率を WST-1 法により測定した (Cell Counting Kit, 同仁化学研究所)。WST-1 法は, ミトコンドリア内酵素活性を指標として細胞数を測定する方法であり, 標準的に用いられている MTT 法の変法である。450 nm における吸光度変化を, マイクロプレートリーダー (NJ-2300, Nalge Nunc Int.) により測定し, 定量結果は KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて, Student's T-test により解析を行った。また, 様々な薬物を GT1-7 細胞に投与した後, Zn (40 μM) を投与し, 24 時間後の細胞生存率を測定した。薬物の効果は, Zn のみ投与した群との比較により判定した。

結果および考察

GT1-7細胞に対して、培養1日後に様々な濃度のZnCl₂水溶液を添加した後、24時間後の細胞生存率を測定した結果、Znは濃度依存的にGT1-7細胞の細胞死を引き起こした(図1A)。また、GT1-7細胞に様々な金属キレーターを投与し、24時間後の細胞生存率をWST-1法により測定した結果、Zn²⁺、Cu²⁺特異的なキレーターであるN,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN; 1 μM)の投与により90.0±2.1%の細胞が死滅し、顕著な細胞死が観察された(図1B)。また、同様にZn²⁺、Cu²⁺特異的なキレーターであるo-phenanthroline (PHE; 25 μM)、clioquinol (CLQ; 5 μM)でも顕著な細胞死が観察された。しかしながら、Fe³⁺に特異性が高いdeferoxamine (DFO; 50 μM)の投与によっては27.1±1.9%しか細胞死は生じなかった。一方、ZnとTPEN(1 μM)を共投与した結果、Zn(25 μM)の共存によって生存率は91.0±7.5%に回復した。しかしながら、共存するZn濃度を50 μMに増加すると、生存率は再び37.8±7.0%に低下した(図1C)。これは、高濃度のZnによる毒性効果によると考えられる。

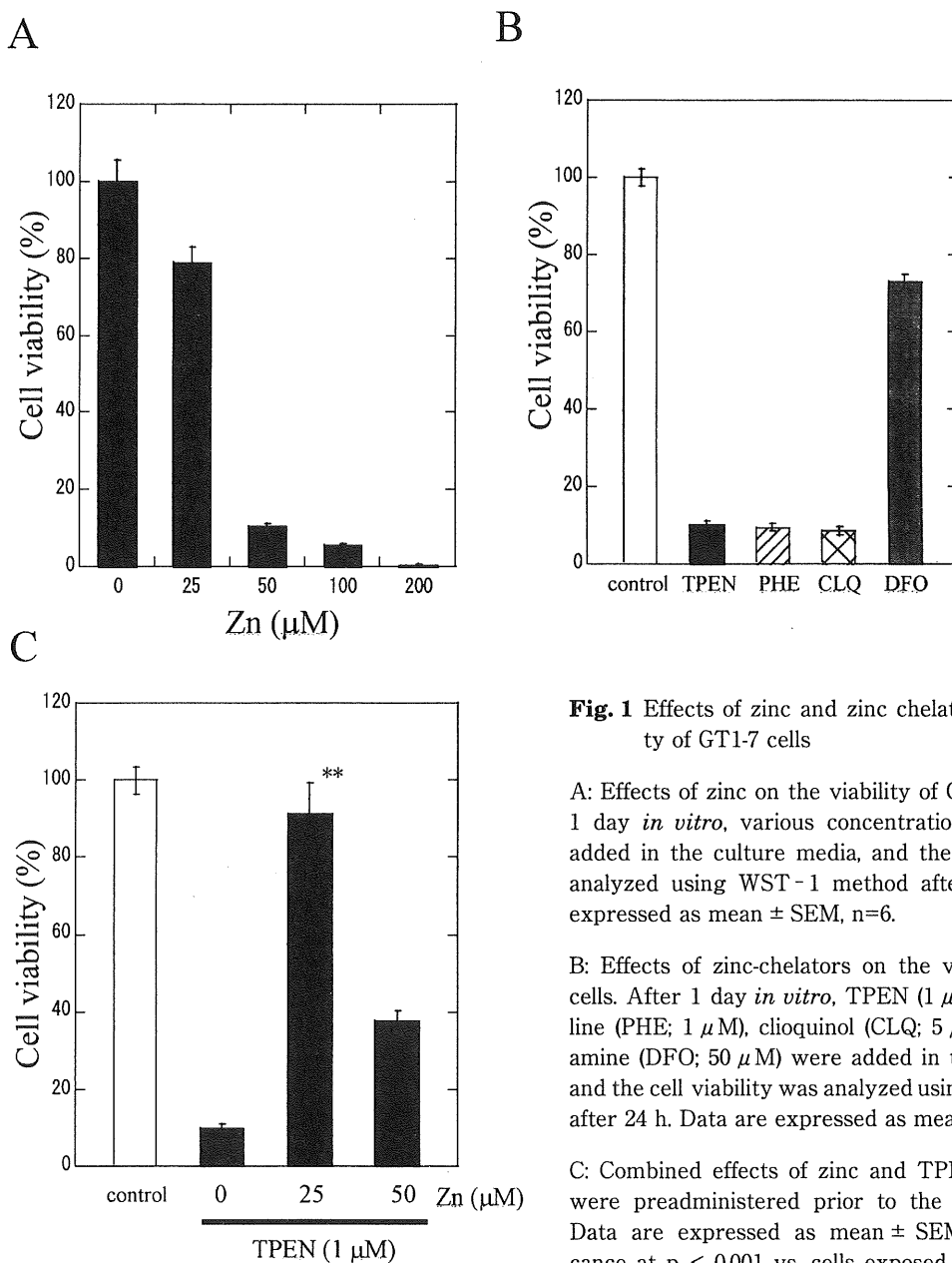


Fig. 1 Effects of zinc and zinc chelators on the viability of GT1-7 cells

A: Effects of zinc on the viability of GT1-7 cells. After 1 day *in vitro*, various concentrations of ZnCl₂ were added in the culture media, and the cell viability was analyzed using WST-1 method after 24 h. Data are expressed as mean ± SEM, n=6.

B: Effects of zinc-chelators on the viability of GT1-7 cells. After 1 day *in vitro*, TPEN (1 μM), o-phenanthroline (PHE; 1 μM), clioquinol (CLQ; 5 μM), and deferoxamine (DFO; 50 μM) were added in the culture media, and the cell viability was analyzed using WST-1 method after 24 h. Data are expressed as mean ± SEM, n=6.

C: Combined effects of zinc and TPEN. TPEN (1 μM) were preadministered prior to the exposure of zinc. Data are expressed as mean ± SEM, n=6. **significance at p < 0.001 vs. cells exposed to TPEN without zinc.

従って、Znのホメオスタシスが、神経細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることが考えられる。我々は、Znによって死滅した細胞がTUNEL陽性であることを報告しており¹⁸⁾、また、アポトーシスのマーカーである phosphatidylserineの細胞表面への露出やミトコンドリア膜電位の異常が観察されることなどから(未発表)、ZnによるGT1-7細胞の細胞死はアポトーシスの性質を持っていることが示唆される。

GT1-7細胞は、マウス視床下部神経細胞の特異的tumorigenesisによって得られた細胞株であるため、簡便に増殖させることが可能であり、神経細胞特異的な性質を保持していることから神経内分泌研究に広く使用されている。今回の結果に示すようにZnに対する感受性が高いことを考えると、GT1-7細胞はZnによる神経細胞死のメカニズムを研究する上で有用な道具となると考えられる。

次に、Znによる神経細胞死のメカニズムを明らかにするために、GT1-7細胞に様々な薬物を投与した直後に、Zn (40 μ M) を投与し、24時間後の生存率をWST-1法により測定した(図2)。Zn (40 μ M) のみを投与した場合の生存率は51 \pm 4%であった。抑制性伝達物質である glycine受容体のアゴニスト、taurine (2 mM)、抑制性伝達物質である GABA受容体のアゴニスト、GABA (100 μ M)、興奮性伝達物質であるグルタミン酸受容体のアゴニスト、glutamate (500 μ M)、抑制性を持つ uridine (100 μ M) の前投与によっては、有意な変化は観察されなかった。従って、ZnによるGT1-7細胞の細胞死においては、このような神経伝達物質の関与は少ないと考えられる。この結果は、Znによる培養大脳皮質神経細胞の細胞死にNMDA型グルタミン酸受容体が関与しているとするKohらの報告⁸⁾とは一致していないが、これはおそらく、GT1-7細胞がグルタミン酸受容体を発現してはいるものの興奮性神経細胞としては働いていないためであろうと考えられる。一方、ピルビン酸ナトリウム (2 mM) は、既に報告しているように、Znによる細胞死を有意に阻害した。ピルビン酸はエネルギー産生系の基質であり、Znによるラット大脳皮質神経細胞の細胞死を阻害すること⁷⁾や、*in vivo*における虚血時の神経細胞の脱落を抑制すること²⁰⁾が報告されている。従って、今回用いた方法をスクリーニング系として用いて、虚血時の神経細胞死を阻害する薬物を探索出来る可能性が考えられる。

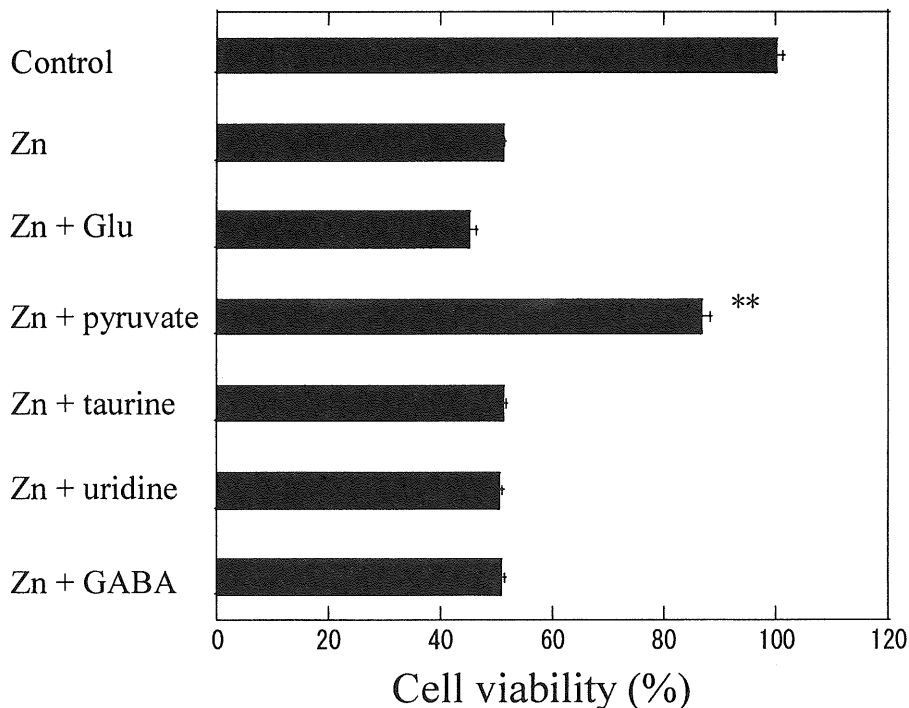


Fig. 2 Effects of various pharmacological agents on zinc-induced neurotoxicity of GT1-7 cells
Pharmacological agents including glutamate (Glu; 500 μ M), sodium pyruvate (pyruvate; 2 mM), taurine (2 mM), uridine (100 μ M), GABA (100 μ M) were preadministered to GT1-7 cells prior to the exposure of Zn²⁺ (40 μ M). After 24 h, the cell viability was analyzed using WST-1 method. Data are expressed as mean \pm SEM, n=6, **significance at p < 0.001 vs. Zn.

さらに、様々な金属がZnによる神経細胞死に及ぼす影響を検討している過程で、 Ca^{2+} が Zn^{2+} による神経細胞死に影響していることが判明した。図3に示すように、 Zn^{2+} 50 μM は顕著な細胞死を引き起こす。また、通常の培地中の Ca^{2+} 濃度は1.8 mMであるが、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を5 mMに増加させることによっても顕著な細胞死が引き起こされ、細胞生存率は16.1 \pm 1.0%に低下した。しかしながら、 Zn^{2+} (50 μM)と Ca^{2+} (5 mM)を共存させた場合には、細胞生存率は96.7 \pm 5.0%に回復した。従って、興味深いことに、Znによる神経細胞死はCaによって阻害される一方で、Caによる神経細胞死はZnによって阻害されることになる。

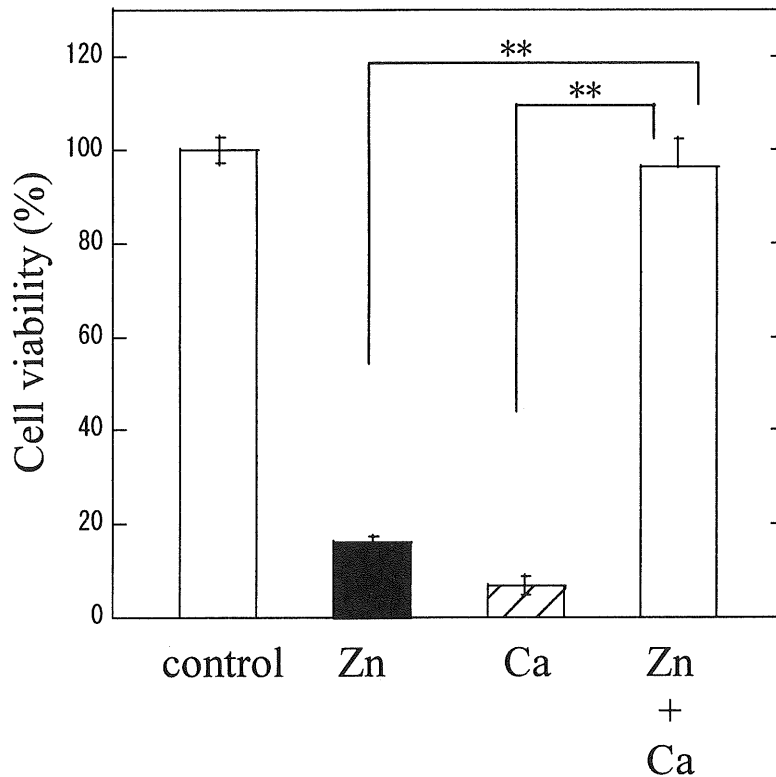


Fig. 3 Effects of calcium on zinc-induced neuronal death

Solutions of zinc (Zn; 50 μM), calcium (Ca; 5 mM), and the combined solution of calcium and zinc (Ca+Zn) were added to GT1-7 cells. After 24 h, the cell viability was analyzed using WST-1 method. Data are expressed as mean \pm SEM, n=6, **significance at $p < 0.001$.

このメカニズムは現在検討中であるが、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの阻害剤がZnによる培養大脳皮質神経細胞やPC12細胞の細胞死を抑制することや⁹⁾、 Zn^{2+} の細胞内流入がAMPA/カイニン酸感受性 Ca^{2+} チャネルにより制御されること²¹⁾などが報告されており、GT1-7細胞において Ca^{2+} が Zn^{2+} の細胞内取り込みに作用している可能性も考えられる。これらの結果は、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスがZnによる神経細胞死メカニズムに重要な役割を果たしていることを示唆しているものである。我々は、Znによる細胞死がガドリニウムやアルミニウムによって阻害されることも報告しており²²⁾、金属間の相互作用が神経細胞死において重要な役割を果たしていることが考えられる。

結 論

本研究の結果から、Znの欠乏あるいは過剰が培養神経細胞の細胞死を引き起こすことが判明し、Znホメオスタシスが神経細胞の生存維持に重要な役割を果たすことが判明した。Znは、神経細胞の活動依存的にシナプス間隙に高濃度で放出される。従って、通常の興奮時には放出されたZnが、アルツハイマー・ β アミロイド蛋白の毒性阻害など、神経細胞の生存維持に働く一方で、虚血時などに高濃度で長時間にわたってZnが存在すると、逆に神経細胞死を引き起

こし、虚血時の遅延性神経細胞死の一因となることが考えられる。また、本研究の結果から、CaホメオスタシスがZnによる神経細胞死に大きく影響することが判明した。従って、金属間の相互作用が神経細胞の生存維持に重要な役割を果たすことが考えられる。また、我々が今回使用したGT1-7細胞はZnによる神経細胞死メカニズムを解明するための有効な実験系になりうると考えられ、本実験系を用いて、様々な薬物をスクリーニングすることにより、Znによる神経細胞死を阻害する物質、ひいては、虚血時の遅延性神経細胞死を抑制する薬物の手がかりが得られる可能性が考えられる。

参考文献

1. Frederickson CJ, Sang WS, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr.* 130: 1471S-1483S.
2. Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR, Darby WJ. (1963) Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism, and anemia. *Arch Intern. Med.* 111: 407-28.
3. Hamadani JD, Fuchs GJ, Osendarp SJ, Huda SN, Grantham-McGregor SM. (2002) Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behaviour of infants: a follow-up study. *Lancet* 360: 290-4.
4. Takeda A. (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34: 137-48.
5. Ueno S, Tsukamoto M, Hirano T, Kikuchi K, Yamada MK, Nishiyama N, Nagano T, Matsuki N, Ikegaya Y. (2002) Mossy fiber Zn^{2+} spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J. Cell Biol.* 158: 215-20.
6. Koh JY., Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272: 1013-1016.
7. Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci.* 20: 3139-3146.
8. Koh JY, Choi DW (1994) Zinc toxicity of cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D aspartate receptors. *Neuroscience*, 4: 1049-1057.
9. Kim AH, Sheline CT, Tian M, Higashi T, McMahon RJ, Cousins RJ, Choi DW. (2000) L-type Ca^{2+} channel-mediated Zn^{2+} toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. *Brain Res.* 886: 99-107.
10. Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY. (1999) Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89: 175-82.
11. Hellmich HL, Frederickson CJ, DeWitt DS, Saban R, Parsley MO, Stephenson R, Velasco M, Uchida T, Shimamura M, Prough DS. (2004) Protective effects of zinc chelation in traumatic brain injury correlate with upregulation of neuroprotective genes in rat brain. *Neurosci. Lett.* 355: 221-5.
12. Small DH, Mok SS, Bornstein JC. (2001) Alzheimer's disease and $A\beta$ toxicity: from top to bottom. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 595-8.
13. Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL. (1993) A novel zinc (II) binding site modulates the function of the $\beta A4$ amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268: 16109-16112.
14. Bush AI, Pettingell WH Jr; Paradis MD, Tanzi RE. (1994) Modulation of $A\beta$ adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* 269: 12152-12158.
15. Kawahara M, Arispe N, Kuroda Y, Rojas E. (1997) Alzheimer's disease amyloid β -protein forms Zn^{2+} -sensitive,

- cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons, *Biophys. J.* 73:67-75.
16. Arispe N, Pollard H, Rojas E. (1996) Zn²⁺ interaction with Alzheimer amyloid β protein calcium channels, *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* 93: 1710-1715.
 17. Rhee SK, Quist AP, Lal R. (1998) Amyloid beta protein-(1-42) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 273: 13379-82.
 18. Kawahara M., Kato-Negishi M., and Kuroda Y. (2002) Pyruvate blocks zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 87-93.
 19. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5: 1-10.
 20. Lee JY, Kim YH, Koh JY. (2001) Protection by Pyruvate against Transient Forebrain Ischemia in Rats. *J. Neurosci.* 21: RC171.
 21. Jia Y, Jeng JM, Sensi SL, Weiss JH. (2002) Zn(2+) currents are mediated by calcium-permeable AMPA/kainate channels in cultured murine hippocampal neurones. *J. Physiol.* 543: 35-48.
 22. Konoha K, Sadakane Y, Kawahara M. (2004) Effects of gadolinium and other metal ions on the neurotoxicity of immortalized hypothalamic neurons induced by zinc. *Biomed. Res. Trace Elem.* (in press).

