

亜鉛によって引き起こされる培養神経細胞の アポトーシスメカニズムの検討

木葉 敬子 川原 正博

Zinc-induced apoptotic death of cultured neuronal cells

Keiko KONOHA and Masahiro KAWAHARA

Abstract

Zinc is an essential trace element for many living things and is present at high concentration in the central nervous system. However, the precise roles of zinc in central nervous system are still unclear. Recent studies have revealed that excessive extracellular zinc is concerned with neuronal death after the transient global cerebral ischemia. We have found that zinc caused marked death of immortalized hypothalamic neurons (GT1-7 cells). In this study, we have investigated the detailed characteristics of zinc-induced neurotoxicity of GT1-7 cells. To elucidate the mechanism of Zn-induced neuronal death, we observed effects of various pharmacological agents.

キーワード：アポトーシス, GT1-7, ガドリニウム, 神経伝達物質

Key words : apoptosis, GT1-7, gadolinium, neurotransmitter

緒言

亜鉛 (Zn) は必須微量元素であり、多くの酵素・機能性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、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⁾。Zn は、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ことや、グルタミン酸受容体に作用することなどから、神経伝達を調節し、神経回路の働きを調節する役割を果たしているのではないかと考えられているが²⁾、その詳細については未だ明らかではない。Zn の欠乏は、免疫系や味覚、嗅覚系の異常を引き起こすことが判明しているが、神経系の行動異常をも引き起こすことが報告されている³⁾。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も報告されている⁴⁾。Zn は、老年性痴呆であるアルツハイマー病脳で蓄積することから、アルツハイマー病の発症に関与する疑いも持たれている^{5, 6)}。一方、Zn が β アミロイド蛋白によって形成されるチャンネルに結合してその作用を阻害するという筆者等の研究は⁷⁾、Zn が神経細胞保護作用を持っていることを示唆している。従って、Zn のホメオスタシスの異常が神経系の異常や神経疾患の発症に関与していることが考えられる。

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⁸⁾。この報告に引き続き、多くの研究結果から 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、さらには脳血管性痴呆を引き起こす可能性が示唆されてきている^{9, 10)}。従って、亜鉛による神経細胞死

のメカニズムを明らかにすることによって、脳血管性痴呆の予防・治療薬開発の手がかりが得られる可能性がある。しかしながら、Zn がどのようなメカニズムで神経細胞死を引き起こすのかは未だ明らかではない。これは、一つには、動物実験が多大な時間や労力を要する為であり、従って、簡便な *in vitro* の実験系の開発が求められてきている。現在、Zn による神経細胞死の *in vitro* 実験系としては、初代培養大脳皮質あるいは海馬神経細胞¹¹⁾、PC12 細胞¹²⁾などが用いられ、報告されているが、Zn に対する感受性や取り扱いやすさなどの点で問題が残る。

筆者等は、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¹³⁾。Zn は、GT1-7細胞に対して、濃度依存的及び投与時間依存的な細胞死を引き起こした。さらに、Znによって細胞死を起こした細胞の多くは、TUNEL陽性であり、アポトーシス様の神経細胞死を起こしていることが示唆された。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、神経突起を伸展させ、MAP2 などの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¹⁴⁾。

そこで、本研究では、この GT1-7 細胞を用いて Zn による神経細胞死のメカニズムを検討し、脳血管性痴呆治療薬の予防・治療薬の手がかりを得ることを目的として検討を行った。まず GT1-7 細胞と、PC12 細胞、B-50 細胞、ラット大脳皮質、海馬初代培養神経細胞など、他の細胞系との Zn に対する毒性を、WST-1 法を用いて定量的に検討した。さらに、様々な薬物を前投与し、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た。また、Zn による GT1-7 細胞の形態変化についても、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

実験方法

1. 試薬

Zinc chloride (ZnCl₂), gadolinium chloride (GdCl₃), sodium pyruvate, uridine, γ -aminobutylic acid (GABA) は Sigma-Aldrich 社より購入した。Aluminium chloride (AlCl₃), vanadium pentoxide (V₂O₅), L-glutamic acid (glutamate), taurine は (株)和光純薬工業より購入した。これらの 10~100 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)、ラット神経芽細胞腫 (B-50 細胞) およびラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12 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% CO₂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 6×10^4 cell/cm² の濃度で播き、CO₂ インキュベーター内で 1~2 日間、培養を行った。

ラット初代培養神経細胞に関しては、ラット胎児 (Wistar 18 日齢) の脳より大脳皮質および海馬を摘出し、パパイン酵素液により酵素消化処理を行った後、血清含有 DMEM もしくは B-27 Supplement (Invitrogen Corp.) を添加した無血清 DMEM に細胞を懸濁して、細胞数を測定し、 3×10^5 cell/cm² の濃度で 96 穴マイクロプレートに播き、培養を継続した。

3. 細胞生存率の測定

GT1-7 細胞、PC12 細胞、B-50 細胞に関しては、培養 1 日後に、様々な濃度の ZnCl₂ 水溶液を投与した。ラット初代培養神経細胞に関しては、培養 1 週間後に培地を無血清 DMEM に交換し、その後に ZnCl₂ 水溶液を投与した。Zn 投与 24 時間後、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)。この方法は、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, ナルジェヌンク) 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。

4. 阻害物質の探索

培養 1 日後、様々な金属や神経伝達物質のアゴニストなどを GT1-7 細胞に投与した後、ZnCl₂ (40 μ M) 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、ZnCl₂ のみ投与した細胞との比較により判定した。

5. 細胞の形態変化

GT1-7 細胞を、0.2% polyethylenimine コーティングしたカバーガラス上にて培養した。培養 1 日後、

ZnCl₂水溶液を投与し、24時間後、GT1-7細胞に、細胞膜結合性蛍光色素である Rhodamine C18 を投与し、蛍光像を倒立型蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus) を用いて観察した。

結果

1. Zn による GT1-7 細胞の細胞死

ZnCl₂水溶液 (1~200 μM) を GT1-7 細胞に投与した結果、濃度依存的な細胞死が生じた。既に、同じ条件下で ZnCl₂ が濃度および時間依存的に GT1-7 細胞の細胞死を引き起こすことを報告しており、その際の LD₅₀ は約 38 μM であった。この条件下で、ZnCl₂ 50 μM の投与 24 時間後には、90 ± 1% の細胞が死滅していた。

GT1-7細胞は、無血清条件下で培養24~48時間後には、神経突起様のprocessを伸展させ、ネットワークを形成する (図 1 A)。この条件下で ZnCl₂ を投与すると、24 時間後には突起が退縮し、細胞体の萎縮が観察された (図 1 B)。

2. 他の細胞系との比較

GT1-7細胞に対するZnの効果の特異的かどうかを判定するために、GT1-7細胞、PC12細胞、B-50細胞、ラット大脳皮質初代培養神経細胞、ラット海馬初代培養神経細胞の各々に、同一条件下で ZnCl₂ 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 (図 2)。その結果、この条件下において PC12 細胞、B-50 細胞や大脳皮質初代培養神経細胞では、ZnCl₂ 0~100 μM の濃度範囲では、ほとんど細胞死を生じなかった。また、ラット海馬神経細胞は ZnCl₂ 50 μM の投与によって 10 ± 4% (mean ± SEM, n=6)、ZnCl₂ 100 μM によって 87 ± 3% の細胞が死滅した。しかしながら、ZnCl₂ 50 μM の投与 24 時間後に生存している GT1-7 細胞は、10 ± 1% に過ぎず、ZnCl₂ 25 μM 以上の濃度で有意な細胞死を起こすことが判明した。従って、GT1-7 細胞は、他の細胞系に比して、Zn に対する高い感受性を持っていることが判明した。

3. 薬物投与の結果

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細胞に様々な金属、神経伝達物質のアゴニスト等を投与した直後に、ZnCl₂ (40 μM) を投与し、

24 時間後の生存率をWST-1法により測定した。図 3 にその結果を示す。ZnCl₂ (40 μM) のみを投与した場合の生存率が 51 ± 4% であった。それに対し、抑制性 glycine 受容体のアゴニスト、taurine (2 mM)、抑制性 GABA 受容体のアゴニスト、GABA (100 μM)、興奮性グルタミン酸受容体のアゴニスト、glutamate (500 μM) の前投与によっては、有意な変化は観察されなかった。エネルギー産生系の基質である sodium pyruvate (2 mM) は、Zn による細胞死を顕著に阻害した。また、様々な金属を投与した結果、バナジウム (V₂O₅; 10 μM) は Zn による細胞死に影響しなかったが、アルミニウム (AlCl₃; 100 μM)、ガドリニウム (GdCl₃; 100 μM) は、Zn による GT1-7 細胞の細胞死を有意に阻害した。そこで、様々な濃度の GdCl₃ を用いてさらに検討を行った結果、GdCl₃ は 100~200 μM の濃度で、濃度依存的に Zn による神経細胞死を抑制することが判明した (図 4)。

考察

Zn は、GT1-7細胞に対して顕著な細胞死を引き起こした。我々は既に、Zn によって死滅した細胞が TUNEL 陽性であることを観察しており、また、アポトーシスのマーカーである AnnexinV が細胞膜表面に顕著に結合することから (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考えられる。

また、他の細胞系に比して、Zn はより低濃度で GT1-7細胞の細胞死を引き起こすことが判明した。この原因については、Zn の細胞内取り込み機構等が他の細胞系と異なっている可能性などが考えられるが、現在検討中である。この結果から、GT1-7 細胞は、今後 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ことが考えられる。

今回の結果から、Zn による GT1-7 細胞の細胞死は Al³⁺、Gd³⁺、pyruvateによって阻害されることが判明した。Pyruvateについては、我々も既に報告しているが、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が報告されている。また、pyruvate は虚血時の神経細胞の脱落を *in vivo* で抑制することが報告されており¹⁵⁾、従って、この方法によって虚血時の神経細胞死を阻害する薬物をスクリーニング出来る可能性が考えられる。また、Sheline らは、Gd³⁺ が Zn²⁺ の細胞内取り込みを阻害する結果、Zn による細胞死を抑制する

ことを報告している¹⁶⁾。Al³⁺によるZn細胞死の阻害メカニズムは未だ不明であるが、同様にZnの細胞内取り込みに関係している可能性があり、今後検討する予定である。

本研究の結果から、GT1-7細胞がZnによる神経細胞死メカニズムを解明するための簡便な実験系になりうる事が判明した。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, C. J., Sang, W. S., Silva, D., *et al.*: Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr.* 130: 1471S-1483S, 2000.
- 2 Ueno, S., Tsukamoto, M., Hirano, T., *et al.*: Mossy fiber Zn²⁺ spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J. Cell Biol.* 158: 215-220, 2002.
- 3 Takeda, A.: Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 34: 137-148, 2000.
- 4 Hamadani, J. D., Fuchs, G. J., Osendarp, S. J., *et al.*: Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental development and behaviour of infants: a follow-up study. *Lancet* 360: 290-294, 2002.
- 5 Bush, A. I., Pettingell, W. H. Jr., Paradis, M. D., *et al.*: Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* 269: 12152-12158, 1994.
- 6 Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., *et al.*: A novel zinc(II) binding site modulates the function of the β A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268: 16109-16112, 1993.
- 7 Kawahara, M., Arispe, N., Kuroda, Y., *et al.*: Alzheimer's disease amyloid β -protein forms Zn²⁺-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. *Biophysical J.* 73: 67-75, 1997.
- 8 Koh, J. Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., *et al.*: The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272: 1013-1016, 1996.
- 9 Sheline, C. T., Behrens, M. M. and Choi, D. W.: Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁺ and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci.* 20: 3139-3146, 2000.
- 10 Yin, H. Z., Sensi, S. L., Ogoshi, F., *et al.*: Blockade of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn²⁺ accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 22: 1273-1279, 2002.
- 11 Koh, J. Y. and Choi, D. W.: Zinc toxicity of cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 4: 1049-1057, 1994.
- 12 Kim, A. H., Sheline, C. T., Tian, M., *et al.*: L-type Ca²⁺ channel-mediated Zn²⁺ toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. *Brain Res.* 886: 99-107, 2000.
- 13 Kawahara, M., Kato-Negishi, M. and Kuroda Y.: Pyruvate blocks zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 87-93 2002.
- 14 Mellon, P. L., Windle J. J., Goldsmith P. C., *et al.*: Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5: 1-10, 1990.
- 15 Lee, J. Y., Kim, Y. H. and Koh, J. Y.: Protection

by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J. Neurosci.* 21: C171, 20R01.

16 Sheline, C. T., Ying, H. S., Ling, C. S., et al.: Depolarization-induced ⁶⁵zinc influx into cultured cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* 10: 41-53, 2002.

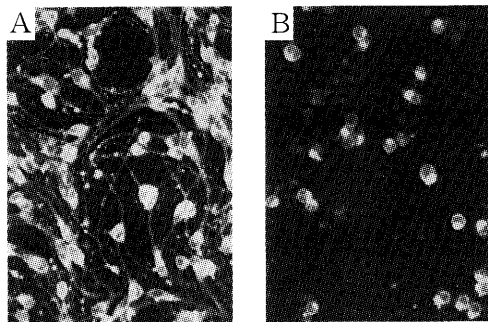


図1 Zn投与による細胞の形態変化

GT1-7細胞に ZnCl₂ (100 μM) を投与し、24時間後に Rhodamine C18 により染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。A: control, B: ZnCl₂ (100 μM)。

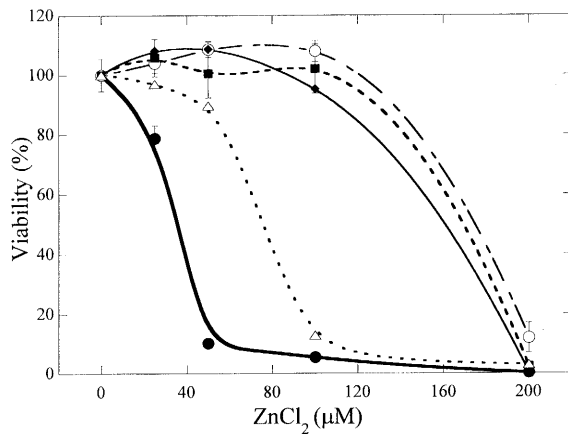


図2 Zn投与による各種神経細胞の細胞死

各種神経細胞に ZnCl₂ (0~200 μM) 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。●: GT1-7, ○: B-50, ■: PC12, ◆: 大脳皮質神経細胞, △: 海馬神経細胞。データは mean ± S.E.M. (n=6) で表した。

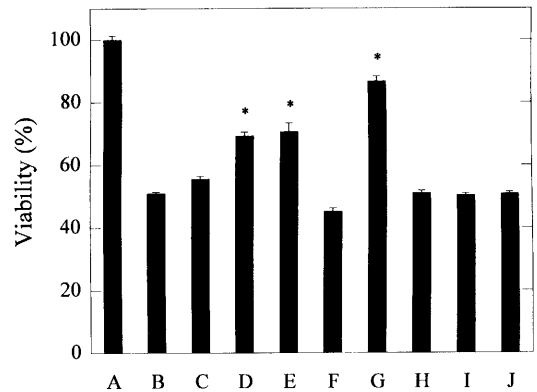


図3 Znによる神経細胞死に対する金属および神経伝達物質のアゴニストの抑制効果

GT1-7細胞に各種金属および神経伝達物質のアゴニストを投与した後、ZnCl₂ (40 μM) 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。A: control, B: ZnCl₂ (40 μM), C: ZnCl₂ + V₂O₅ (10 μM), D: ZnCl₂ + AlCl₃ (100 μM), E: ZnCl₂ + GdCl₃ (100 μM), F: ZnCl₂ + glutamate (500 μM), G: ZnCl₂ + sodium pyruvate (2 mM), H: ZnCl₂ + taurine (2 mM), I: ZnCl₂ + uridine (100 μM), J: ZnCl₂ + GABA (100 μM)。データは mean ± S.E.M. (n=6) で表し、ZnCl₂ (40 μM) のみを投与した群と比較した。*p<0.001

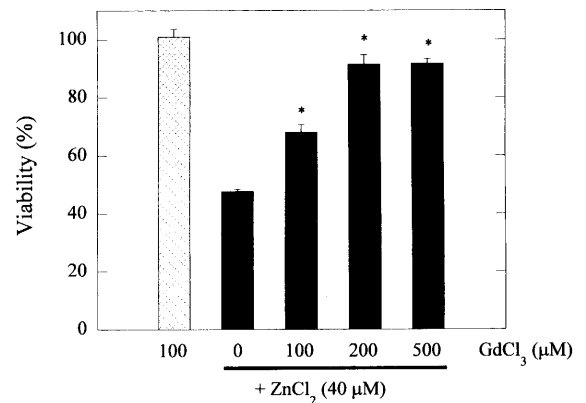


図4 Znによる神経細胞死に対するGd³⁺の抑制効果

GT1-7細胞に各種濃度のGdCl₃を投与した後、ZnCl₂ (40 μM) 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。データは mean ± S.E.M. (n=6) で表し、ZnCl₂ (40 μM) のみを投与した群と比較した。*p<0.001