

酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける  
亜鉛動態変動を介した細胞機能制御に関する研究

2017 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

古田 能裕

# 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 薬学専攻博士課程

氏名 (英字名) 古田 能裕 (Takahiro Furuta)

学位論文題目 酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける亜鉛動態変動を介した細胞機能制御に関する研究

序論 (はじめに)

脳高次機能維持には神経及びグリア細胞間の伝達物質を介した機能連関が重要であり、この破綻は精神神経疾患などの発症に寄与すると考えられている。近年増加の一途にあるうつ病などの気分障害はセロトニン・ノルアドレナリンなどを介した神経伝達の異常に起因すると考えられており、このモノアミン仮説に基づいた薬物治療が行われている。しかしながら、その治療成績は十分なものではなく、より画期的な治療法の確立が望まれている。このような中、うつ病の発症において、酸化ストレスの負荷に起因したグリア細胞、特にアストロサイトの機能変化並びに亜鉛や ATP などの情報伝達物質の脳内動態変動が中心的役割を担うことが明らかとなってきた。

これまで著者の研究室では、アストロサイトへの一酸化窒素の産生を伴った低浸透圧ストレス負荷が細胞内外の亜鉛動態を変動させること、またアストロサイトの異物貪食機能が ATP 受容体の一つである P2X7 受容体 (P2X7R) により制御されることを報告してきた。しかしながら、酸化ストレスが負荷されたアストロサイトにおいてその貪食能を含めた細胞機能に変化するか否か、またその制御機構に関する情報は未だ得られていない。そこで本研究では、酸化ストレスを負荷したアストロサイトにおける細胞内外の亜鉛動態変動がその細胞機能に与える影響について精査した。

## 第1章 亜鉛動態の変動

脳神経系細胞外において認められる亜鉛は、神経興奮に伴ってシナプス前小胞から分泌されるものと考えられてきた。しかしながら、酸化ストレスを生じる脳虚血などの病態時における細胞外亜鉛レベルの増大には少なくとも急性期及び慢性期の二相性プロファイルが認められることから、神経細胞以外の細胞からの亜鉛放出が推測される。そこで、酸化ストレスを負荷したアストロサイトの細胞内外における亜鉛動態について検討した。アストロサイトの細胞生存率に影響を及ぼさないことが確認された酸化ストレス負荷条件 (400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 24 時間作用) において、アストロサイトの活性化の指標である細胞形態の変化及び glial fibrillary acidic protein の発現増大、並びに酸化ストレスの指標である 4-hydroxy-2-nonenal の発現が認められた。このときの細胞外亜鉛レベルを ICP-MS により測定したところ、酸化ストレス負荷後 2 時間までは経時的に増大し、その後 24 時間まではほぼ変化しなかった。一方、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの細胞内亜鉛レベルをその蛍光指示薬である ZnAF-2 DA を用いて絶対定量したところ、酸化ストレス負荷 2 時間後において約 2  $\mu\text{M}$  の最大値となり、その後低下したものの、その濃度は control 群のそれよりも有意に高かった。これらのことから、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、細胞外及び細胞内のいずれにおいても亜鉛レベルが増大し、その変動プロファイルは両コンパートメントにおいて類似したものであることが明らかとなった。

## 第2章 細胞外亜鉛クリアランスの変動

脳神経系細胞外において亜鉛が過剰に存在する場合、神経細胞死が誘発されるとともに、

ミクログリアの活性化を介したその増悪が引き起こされる。したがって、情報伝達物質としての亜鉛の細胞外レベルは厳密に制御される必要がある。これまでに細胞外亜鉛のクリアランスは主にアストロサイトに発現する亜鉛トランスポーターの一つである ZIP1 を介して行われることがわかっているものの、酸化ストレス負荷条件下におけるその機能的発現変動に関する情報は少ない。そこで、酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおける亜鉛クリアランスについて検討した。アストロサイトによる放射性トレーサーである  $^{65}\text{Zn}$  の取り込みは、酸化ストレス負荷により有意に増大し、速度論的解析からそれは ZIP1 の発現増大に起因する可能性が示唆された。そこで酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける ZIP1 の発現をウェスタンブロット法及び免疫細胞染色法により評価したところ、その総発現量のみならず、細胞膜における発現量も増加していた。これらのことから、アストロサイトによる ZIP1 を介した亜鉛クリアランスは酸化ストレス負荷により増大することが示され、このアストロサイトの機能変化は細胞外に過剰に存在する亜鉛を除去することにより脳神経系細胞傷害に対して保護的に機能するものであると考えられる。

### 第3章 細胞内亜鉛による食食活性制御

アストロサイトの持つ食食機能は P2X7R により制御されている。一方、これは酸化ストレス負荷によって増大または低下するとの相反する報告がなされており、明確な結論は得られていない。そこで、アストロサイトに対して酸化ストレスを負荷した際の P2X7R を介したその食食機能の変化について検討した。アストロサイトの食食活性を latex beads の細胞内取り込みにより評価したところ、酸化ストレス負荷群によるその亜鉛取り込みは、control 群の場合より少なく、これは P2X7R の活性の指標である YO-PRO-1 取り込みの低下と対応していた。次に、P2X7R の発現プロファイルを検討した結果、その細胞膜における発現は酸化ストレス負荷により減少した。この P2X7R の細胞膜における発現局在の変化は、細胞膜透過型亜鉛キレートである TPEN (2  $\mu\text{M}$ ) の前処理によって部分的に抑制され、またアストロサイトの P2X7R 活性及び食食活性も control レベルまで回復した。P2X7R の活性は細胞膜において full length によるホモ三量体 (約 240 kDa) 形成時に最も高く、その C 末端欠損体である splice variants とのヘテロ三量体の形成により低下することが報告されている。そこで、アストロサイトにおける P2X7R の三量体形成に対する酸化ストレス負荷の影響を blue native PAGE 法により評価した。まず、full length のみを検出する抗 P2X7R 抗体を用いたところ、control 群において約 240 kDa 付近に検出された P2X7R の免疫活性は酸化ストレス負荷群において減少していたのに対し、full length 及び splice variants と反応する抗体を用いた場合ではその免疫活性に変化はなかった。これらの結果から、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの細胞内遊離型亜鉛レベルの増大は細胞膜における P2X7R の機能的発現を減少させ、それによりアストロサイトの食食機能を低下させることが明らかとなった。

### 総括 (結論)

本研究の遂行により酸化ストレスを負荷されたアストロサイトでは細胞内外の亜鉛シグナリングの変動を介して細胞の機能性が変化することが明らかとなった。このことと、アストロサイトから放出された亜鉛が P2X7R の活性化を介してミクログリアを活性化し、その食食活性を誘導することを考え併せると、亜鉛はアストロサイト及びミクログリアの機能変化を惹起する重要な分子であり、そのアストロサイトにおける動態制御はうつ病などに対する新規治療法の開発につながる可能性が考えられる。

## 目次

序論	1
第1章 亜鉛動態の変動	
緒言	3
実験材料及び方法	4
1. 試薬	4
2. マウス大脳皮質アストロサイト及びミクログリアの培養	4
3. 過酸化水素 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 処理	4
4. 免疫細胞染色	5
5. 細胞生存率の測定	5
6. 亜鉛濃度の評価	5
7. ミクログリア活性化の評価	6
8. 統計学的処理	6
実験成績	7
1. アストロサイトに対する酸化ストレス負荷条件の確立	7
2. 細胞外及び細胞内における亜鉛動態の変動	8
3. ACM 処理によるミクログリアの活性化	10
考察	11
第2章 細胞外亜鉛クリアランスの変動	
緒言	13
実験材料及び方法	14
1. 試薬	14
2. マウス大脳皮質アストロサイトの培養	14
3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理	14
4. 取り込み実験	14
5. 速度論的解析	14
6. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)	14
7. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	15
8. 免疫細胞染色	16
9. 統計学的処理	17
実験成績	18
1. <sup>65</sup> Zn の取り込み特性	18
2. ZIPs 及び ZnTs の mRNA 発現減少	19
3. ZIP1 タンパク質発現の増大	20

考察	22
第3章 細胞内亜鉛による食食活性制御	
緒言	24
実験材料及び方法	25
1. 試薬	25
2. マウス大脳皮質アストロサイトの培養	25
3. HEK293T 細胞の培養	25
4. HEK293T/mP2X7R 細胞の培養	25
5. mP2X7R splice variant-3 及び-4 cDNA の導入	26
6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理	26
7. P2X7R のチャネル/ポア活性の評価	26
8. アストロサイトの食食活性の評価	26
9. Real-time PCR	26
10. 免疫細胞染色	27
11. SDS-PAGE	27
12. Blue native-PAGE (BN-PAGE)	27
13. 細胞外 ATP 濃度の測定	28
14. 統計学的処理	28
実験成績	29
1. アストロサイトの食食活性及び P2X7R チャネル/ポア活性の低下	29
2. P2X7R の発現局在の変動	30
3. P2X7R の機能的発現低下に対する細胞内遊離型亜鉛増大の寄与	30
4. P2X7R の機能的発現低下に対する細胞外亜鉛及び ATP の関与	33
5. P2X7R の発現及び P2X7R 三量体の構成に対する影響	35
6. 細胞膜における P2X7R full length 発現に対するその splice variants の影響	38
考察	39
総括	41
引用文献	44
研究業績目録	51

## 【略語表】

ACM	astrocytic conditioned medium
Ara-C	cytarabine
Bead	yellow-green carboxylate latex beads
BN-PAGE	blue native polyacrylamide gel electrophoresis
BSA	bovine serum albumin
BSS	balanced salt solution
CaEDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, calcium (II), disodium salt
CBB	coomassie brilliant blue
DFP	diisopropyl fluorophosphate
db-cAMP	dibutyryl-cyclic AMP
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNase	deoxyribonuclease
DTT	dithiothreitol
EGTA	O,O'-bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EMEM	eagle's minimal essential medium
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GLAST	glutamate aspartate transporter
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK293T	human embryonic kidney 293T
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
HRP	horseradish peroxidase
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometer
K <sub>m</sub>	Michaelis constant
KN-62	1-[N, O-bis-(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4- phenylpiperazine
LDH	lactate dehydrogenase
MT-3	metallothionein-3
OGD	oxygen glucose deprivation
oxATP	oxidized ATP
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	0.1 % Tween-20-containing phosphate buffered saline
PEI	polyethyleneimine
PI	propidium iodide
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF	polyvinylidene difluoride
P2X7R	P2X7 receptor
P2X7R-v	P2X7 receptor splice variant
real-time PCR	real-time polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
S.D.	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	single nucleotide polymorphism
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
TRPM7	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7
YP	YO-PRO-1
ZIP	Zrt-/Irt-like protein
ZnEDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, zinc (II), disodium salt
ZnT	zinc transporter

## 序 論

中枢神経系は、神経活動の中心的役割を担う神経細胞と、アストロサイト、ミクログリア及びオリゴデンドロサイトといったグリア細胞により構成され、それぞれの細胞が機能的及び構造的に連関することで高次機能を維持している。アストロサイトは中枢において最も数多く存在している細胞種であり、細胞間隙を埋めるように存在することで神経細胞を構造的に支持するだけでなく、血液脳関門の形成やグルタミン酸などの情報伝達物質の放出、アミノ酸の合成を介した神経細胞への栄養供給にも関与する (1, 2)。ミクログリアは脳における免疫担当細胞であり、異物の除去及び死細胞の貪食を行うことで正常な脳内環境の維持に寄与する (3)。さらにミクログリアは神経細胞と連関することにより、シナプスにおける神経細胞の樹状突起の形成を制御することも報告されている (4)。また、オリゴデンドロサイトは神経細胞軸索においてミエリンを形成し、跳躍伝導を引き起こすことにより神経活動の維持に関与する (5)。このような神経－グリア細胞間の機能的連関は種々の情報伝達物質を介して行われている。

現在本邦では、精神疾患の罹患率と自殺者の増大が社会的な問題となっている。代表的な精神疾患であるうつ病の罹患率は増加の一途をたどっており、地域医療において優先的に取り組むべき疾病とされてきた従来の4大疾病（がん、脳卒中、心筋梗塞及び糖尿病）に対し、新たに精神疾患も加えられた (6)。うつ病の発症には、情報伝達物質であるモノアミン類の不足に起因するという古典的モノアミン仮説が提唱されており、今日の治療はそれに基づき、セロトニンやノルアドレナリンの再取り込みを標的とした薬物治療が行われている。しかしながら、抗うつ効果が表れるまでに2~3週間要することや回復期における再発などが問題となることから、その治療成績は十分なものとは言えず、より画期的な治療法の確立が望まれている。

近年、うつ病の発症要因として、遺伝的要因や環境要因に加えて、中枢に対する酸化ストレス負荷が注目されている (7, 8)。活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の産生に伴って酸化ストレスが発生し、これは神経細胞死を惹起するなど脳神経系細胞の機能を障害する。また、うつ病の発症にはグリア細胞の機能的変化が寄与することも報告されており (9)、うつ病患者の死後脳においても、アストロサイトの減少が認められている (10)。この所見はマウスを用いた研究においても再現されていることから (11)、アストロサイトの機能変化がうつ病の発症に関与することも強く示唆され、グリア細胞が新たなうつ病の治療標的として有望であると考えられる。

亜鉛は必須微量元素の一つであり、生体内のほとんどの組織においてタンパク質などの高分子と結合して存在し、種々の重要な生理機能を果たしていることから、その恒常性維持は正常な生体機能を発揮するうえで重要である。近年、食文化の変化や加齢に伴う亜鉛欠乏が問題となっており、それは味覚障害や皮膚障害だけでなく、免疫システムの破綻や発達遅延にも影響することが知られている (12)。中枢における亜鉛は、主にシナプス前終末の小胞内



にグルタミン酸とともに蓄えられており、神経細胞の興奮に応じてシナプス間隙に放出されることで神経伝達物質として機能し、海馬での記憶形成などにおいて中心的な役割を果たす(13)。一方、亜鉛の恒常性の破綻は、その過剰や欠乏に起因した障害を引き起こす。生理的状态の中枢において、亜鉛の細胞外濃度は厳密に保たれているものの、虚血/再灌流などにより生じた酸化ストレスはその細胞外濃度を増大させ、神経細胞死を惹起する(14, 15)。一方、亜鉛欠乏は亜鉛を介した情報伝達を減弱させるため、神経活動の低下を引き起こし、これはうつ様行動の発症に寄与することが示唆されている(16)。また、亜鉛は神経伝達物質としてだけでなく、グリア細胞間の伝達物質としても機能しており、酸化ストレスが負荷されたアストロサイトは細胞外への亜鉛放出を増大させ、それは近傍のミクログリアの活性化を介して神経細胞死を増悪させることが明らかになっている(17)。さらに、アストロサイトの細胞内遊離型亜鉛レベルは、酸化ストレス負荷により増大し、それによりカスパーゼの活性化を介したアストロサイトの細胞死が導かれることも報告されている(18)。

以上より、中枢神経系における酸化ストレスの発生は、亜鉛動態の変動を誘発し、それによる神経細胞の機能形態的变化が、うつ病などの発症に繋がることから、亜鉛を介したシグナリングの解明は精神神経疾患治療の新たな治療戦略につながる可能性が考えられる。しかしながら、これまでの多くの研究は、細胞致死的な酸化ストレス負荷条件下で行われており、うつ病などの発症において、細胞に傷害を与えない程度の酸化ストレスを負荷した際のアストロサイトにおける亜鉛動態を評価した報告は皆無である。また、アストロサイトの細胞機能が、亜鉛動態変化により影響されるかについての研究は認められないのが現状である。

そこで本稿では、細胞傷害を生じない程度の酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおける亜鉛動態変動を介した細胞機能制御について詳細に検討し、得られた成績について論述する。

## 第1章 亜鉛動態の変動

### 緒言

中枢において神経及びグリオ伝達物質として機能する亜鉛は、グルタミン酸作動性神経の前シナプス小胞にグルタミン酸とともに貯蔵されており、神経興奮に伴ってシナプス間隙へと放出される。そのため、これまで細胞外亜鉛の主な供給源は神経細胞であると考えられてきた。しかしながら、中大脳または総頸動脈閉塞による脳虚血時において、強い酸化ストレスが生じた際の細胞外の亜鉛レベルを評価した検討では、それは酸化ストレス負荷後 15~30 分 (急性期) 及び 6~36 時間 (慢性期) に高まる二相性のプロファイルを示すことが報告されており (19, 20)、急性期の亜鉛増大は神経細胞からの亜鉛放出によるものであるのに対し (19)、慢性期での増大はアストロサイトからの亜鉛放出に起因することが示唆されている (20)。

過酸化水素により、細胞死を生じるような致死的な酸化ストレスを負荷されたアストロサイトは、細胞内亜鉛の増大を介して細胞死に至ることが報告されている (18)。また、一酸化窒素の産生を伴った低浸透圧ストレス負荷は、アストロサイト細胞内遊離型亜鉛の増大に加え、細胞外への亜鉛放出を惹起することも明らかになっている (17, 21)。一方、うつ病のような精神神経疾患の発症要因の一つとして、軽度な酸化ストレスの慢性的な負荷が関与することは古くから示唆されている (22, 23)。実際、うつ病のモデル動物の作製方法として、拘束などの物理的刺激によるストレスや、他のマウスからの攻撃による社会的な敗北を介して負荷される精神的ストレスがあり、これらを反復的に負荷する方法が広く用いられている (24, 25)。また、モデル動物の脳内において脂質の過酸化や酸化ストレスマーカーの一つである p47<sup>phox</sup> の発現が増加することから、酸化ストレスが生じていることが示されている (26, 27)。このような酸化ストレス負荷時において、細胞内外の亜鉛動態は変化し、それが病態に関与することが考えられる。しかしながら、これまでに細胞傷害を生じない程度の酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおいて、その亜鉛動態変動を詳細に検討した報告はない。

そこで、本章ではまず、アストロサイトに対する細胞傷害を引き起こさない酸化ストレスの負荷条件を検討し、その条件下での細胞内外における亜鉛動態を評価した。

## 実験材料及び方法

### 1. 試薬

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 、  $N,N,N',N'$ -tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN)、 ethylenediamine- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid, calcium (II), disodium salt (CaEDTA) 及び n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside は同仁化学から、papain、deoxyribonuclease (DNase)、sodium pyruvate 及び bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich から購入した。ZnAF-2 DA は Chemodex から購入した。その他の試薬は和光純薬工業から購入し、いずれも特級若しくはそれ以上の規格のものを使用した。

### 2. マウス大脳皮質アストロサイト及びミクログリアの培養

実験には ddY 系マウス (日本 SLC) 出生 1-2 日後の新生仔を用いた。氷冷 Hanks' balanced salt solution (HBSS; 136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.167 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5.6 mM D-glucose, 2.38 mM HEPES, pH 7.2) 中にて脳を摘出し、定法に従い実体顕微鏡下において大脳皮質を単離した。単離した大脳皮質を氷冷 HBSS 中にて眼科用鉗を用いて細片化し、細胞懸濁液とした。得られた細胞懸濁液を 40 units/mL papain 及び 1 mg/mL DNase と混和し、10 分間、37°C において加温した後、25°C、1750 $\times$ g の条件下で 5 分間の遠心分離を行った。上澄を除去した後、細胞を適量の 10% fetal bovine serum (FBS) 及び 2 mM L-glutamine 含有 Eagle's minimum essential medium (EMEM; 日水製薬) を用いて再懸濁し、単位容積当たりの細胞数を計数した。培養液中の細胞を 6 または 24 well cell culture plate (Corning) に  $6.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 気流下にて培養を行った。培養開始後、3 または 10 日目に 10% FBS 及び 2 mM L-glutamine 含有 EMEM にて培地交換を行った。培養開始後 15 日目において培地を穏やかに振動させ、浮遊するミクログリアを回収、24 well cell culture plate に再播種後、2 日間培養したものを実験に用いた。またアストロサイトの純粋培養系とするため、ミクログリア回収後の細胞に 20  $\mu$ M cytarabine (Ara-C) を作用させることで、残存するミクログリアの増殖を抑制し、2 日後に 3% FBS 及び 2 mM L-glutamine 含有 EMEM に交換した。その後、7 日毎に培地交換を行い、アストロサイトは 20~40 日間培養したものを実験に用いた。免疫細胞染色により、培養アストロサイト及びミクログリアの純度を定量解析したところ、それぞれ 97% 及び 99% 以上であった (28)。なお、本実験プロトコルは、京都薬科大学動物実験委員会により承認され、本学「動物実験に関する指針」に沿って実験を行った。

### 3. 過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 処理

実験緩衝液には、5% CO<sub>2</sub> を飽和させた balanced salt solution (BSS; 134 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15.7 mM,  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM glucose, pH 7.2) を用いた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  は 0~1000  $\mu$ M の濃度となるように BSS を用いて調製した。アストロサイトは BSS 中にて 10 分間プレインキュベーションした後、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加することにより酸化ストレス負荷を開始した。一定時間経過後、その上澄または細胞を回収し、各実験に用いた。なお、細

胞上澄は、95°C、5 分間で熱不活化した後、4°C、20800×g で 5 分間遠心分離し、アストロサイト培養上澄 (astrocytic conditioned medium (ACM)) として用いた。

#### 4. 免疫細胞染色

細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、固定液 (4% paraformaldehyde (PFA)) で 4°C にて 15 分間固定を行い、再び PBS で洗浄した。細胞形態の変化を位相差顕微鏡により観察した後、70%、90%及び 100%のエタノールを用いて脱水した。ブロッッキングは 0.2% Triton X-100 及び 0.1% BSA 含有 PBS を用いて室温にて 30 分間行い、その後、一次抗体を 4°C にて一晩作用させた。PBS を用いて細胞を洗浄し、二次抗体を室温、遮光条件下にて 1 時間反応させた後、PBS により洗浄し、VECTASHIELD® Mounting Medium (VECTOR) を用いてスライドガラスに封入した。細胞の観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 800 (Carl Zeiss) により行った。なお、一次抗体は rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000, catalogue number: G9269, Sigma-Aldrich) 及び mouse anti-4-hydroxynonenal (4-HNE; 1:250, catalogue number: HNE13-M, Alpha Diagnostic) 抗体、また二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse (1:1000, catalogue number: A11029; Invitrogen) 及び Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit (1:1000, catalogue number: A11035; Invitrogen) 抗体を使用した。蛍光強度の定量は LSM 800 のスペクトラム解析により行った。

#### 5. 細胞生存率の測定

細胞生存率は lactate dehydrogenase (LDH) 法により評価した。アストロサイトは BSS 中にて 10 分間プレインキュベーションし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 24 時間処理後に、ACM を回収した。ACM に対し、LDH buffer (500 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 28.2 µM phenol red, 2.5 mM sodium pyruvate, 0.38 mM NADH) を加え、マイクロプレートリーダーにて波長 380 nm における吸光度を測定した。細胞外 LDH 量は、NADH の吸光度の単位時間あたりの低下率より求め、それらを全 LDH 量で除することにより細胞生存率を算出した。

#### 6. 亜鉛濃度の評価

##### 6-1. 細胞外亜鉛濃度

細胞外亜鉛濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS; Agilent7700, Agilent Technologies) を用いた。回収した ACM に硝酸を最終濃度 5% となるように添加し、サンプルとした。亜鉛濃度の定量は、亜鉛標準液を段階希釈することにより作製した検量線に基づいて行った。なお、内部標準物質として 1 ppm インジウム標準液を用い、サンプル及び検量線のそれぞれに添加した。

##### 6-2. 細胞内遊離型亜鉛濃度

細胞内遊離型亜鉛濃度は、細胞内の遊離型亜鉛に対する特異的プローブである ZnAF-2 DA を用いて測定した (29, 30)。アストロサイトは細胞培養液を除去し BSS に置換した後、8 µM

ZnAF-2 DA を 30 分間作用させた。その後、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を処理し、一定時間経過後、蛍光顕微鏡を用いて蛍光画像を得た。ZnAF-2 蛍光画像の定量には Adobe Photoshop<sup>®</sup> を用い、得られた蛍光強度は、アストロサイトに亜鉛イオノフォアである zinc pyrithione (ZnPT; 0-5  $\mu\text{M}$ , 5 分) を処理することで作製した検量線に基づき、細胞内遊離型亜鉛濃度に換算した (31, 32)。

#### 7. ミクログリア活性化の評価

Control 及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群の ACM に対し、CaEDTA を 0~100  $\mu\text{M}$  となるように添加したものをミクログリアに処理した。その 2 時間後に細胞を固定液 (50% acetone + 50% methanol) で 4°C にて 15 分間処理し、位相差顕微鏡下でその細胞を撮影した。枝状突起が細長く、2 本以上認められ、細胞体が小さいものを静止状態にあるミクログリアと定義し、その他の形態のミクログリアを活性化状態として、全細胞数に対する活性化ミクログリア細胞数を基に活性化率を算出した (17, 33, 34)。

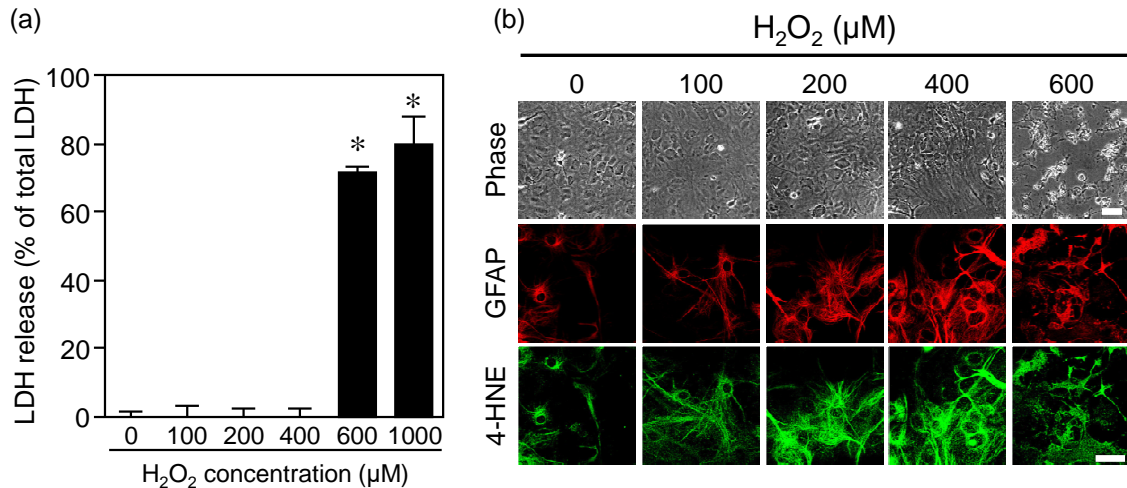
#### 8. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) にて表示した。有意差検定は Ohishi らの報告に基づき (35)、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、多群間比較には 2 元配置分散分析 (Tukey's test) を適用し、得られた  $p$  値が 0.05 未満 (両側) の場合を有意差ありとした。

## 実験成績

### 1. アストロサイトに対する酸化ストレス負荷条件の確立

アストロサイトへの酸化ストレス負荷条件を検討するため、0~1000  $\mu\text{M}$  の濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  をアストロサイトに 24 時間処理し、そのときの細胞生存率を評価した。400  $\mu\text{M}$  までの濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を処理したアストロサイトでは、細胞外に放出された LDH は検出限界以下であった。一方、600  $\mu\text{M}$  以上の  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理では、その放出が有意に増加していた (Fig. 1a)。さらに、細胞の形態変化並びに活性化アストロサイトのマーカーである GFAP 及び酸化ストレスのマーカーである 4-HNE の発現を評価した結果、400  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理では仮足の伸長を伴った形態変化とともに、GFAP 及び 4-HNE の免疫活性が増大していた。一方、600  $\mu\text{M}$  以上の濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  では細胞体の萎縮を伴った細胞傷害が認められた (Fig. 1b)。この結果より、以後の実験では、アストロサイトに対する細胞傷害を生じない程度の酸化ストレス負荷は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を 400  $\mu\text{M}$  の濃度にて 24 時間処理することとした。



**Fig. 1. Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treatment on astrocytic viability and morphology.**

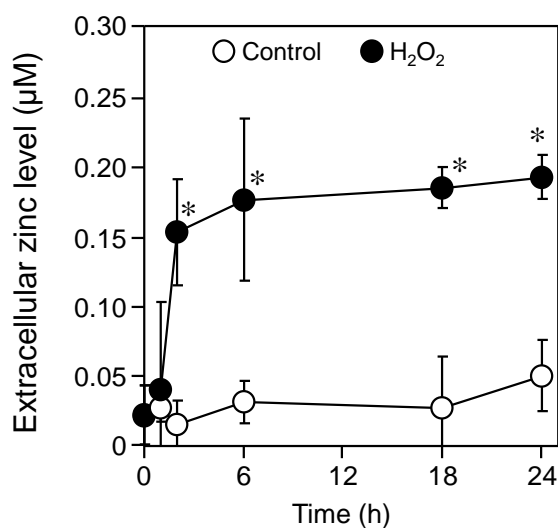
After astrocytes had been treated with the indicated concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h, they were used for following experiments. In panel a, cell viability was evaluated by the LDH assay and each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p < 0.05$  (vs. no  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment). Panel b shows astrocytic morphology, and the immunoreactivities of GFAP (red) and 4-HNE (green). Representative photomicrographs for three independent experiments are shown. Bar = 40  $\mu\text{m}$ .

## 2. 細胞外及び細胞内における亜鉛動態の変動

前項にて決定した条件において酸化ストレスを負荷されたアストロサイトの亜鉛動態の変動を評価した。まず、ACM 中の亜鉛濃度を測定したところ、control 群では評価したいずれの時間においてもその濃度にほとんど変化がなかったのに対し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群のそれは処理後 2 時間において約  $0.2 \mu\text{M}$  まで有意に増加し、その後 24 時間までその濃度はほぼ一定であった (Fig. 2)。

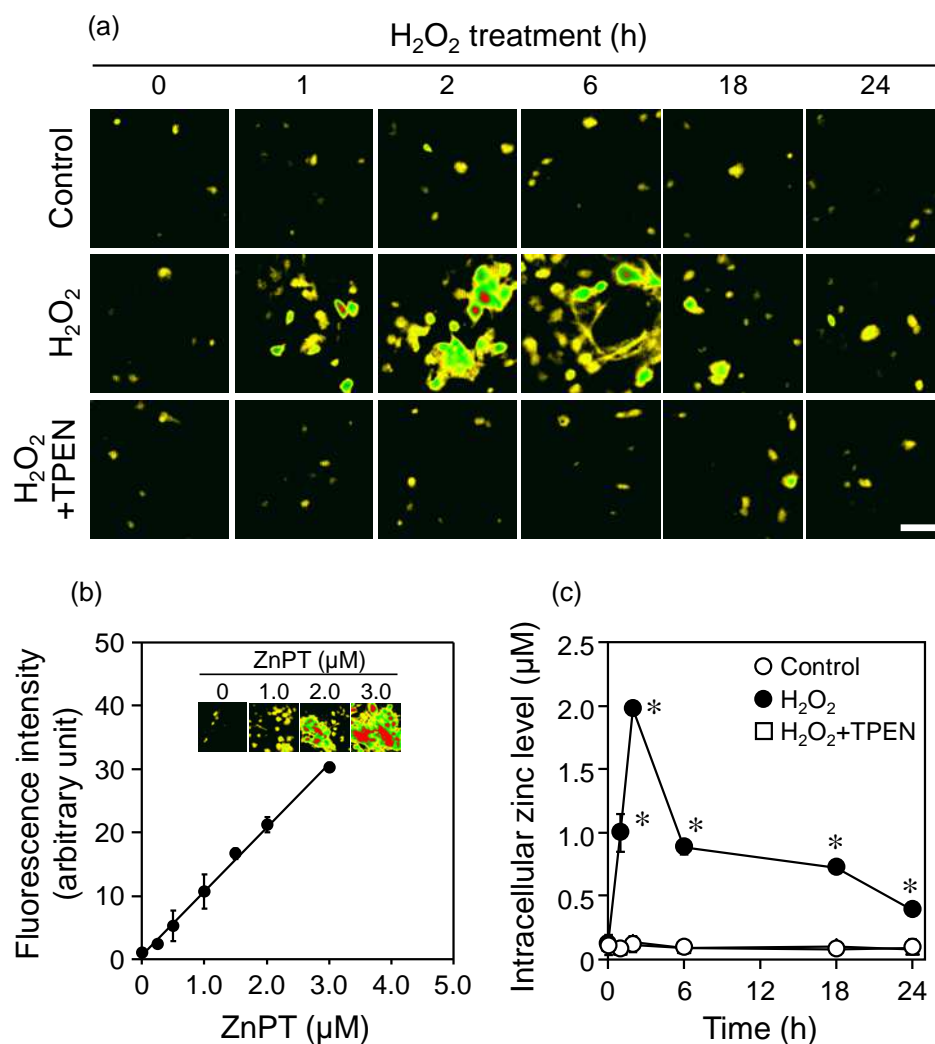
次に、細胞内遊離型亜鉛レベルを評価した。Control 群のアストロサイトでは、ZnAF-2 に由来する蛍光はいずれの時間においてもほとんど検出されず、そのプロファイルは細胞膜透過型亜鉛キレートである TPEN 処理群の場合と同様であった。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群では、ZnAF-2 の蛍光は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理後、時間の経過とともに増大し、2 時間で最も強くなり、その後、低下することが分かった (Fig. 3a)。これら ZnAF-2 蛍光強度を、Fig. 3b に示す ZnPT を用いて作製した検量線に基づき定量した結果、細胞内亜鉛レベルは  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理 2 時間後に約  $2 \mu\text{M}$  となり、その後低下するものの、24 時間後においても control 群の値と比較して有意に高いことが分かった (Fig. 3c)。

これらの結果より、酸化ストレスを負荷されたアストロサイトはその細胞外及び細胞内の亜鉛レベルを増大させることが明らかとなった。



**Fig. 2. Time-dependent increase of extracellular zinc levels in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with  $400 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for the indicated times, extracellular zinc levels were determined by ICP-MS. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p < 0.05$  (vs. respective control).



**Fig. 3. Time-dependent increase of intracellular labile zinc levels in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

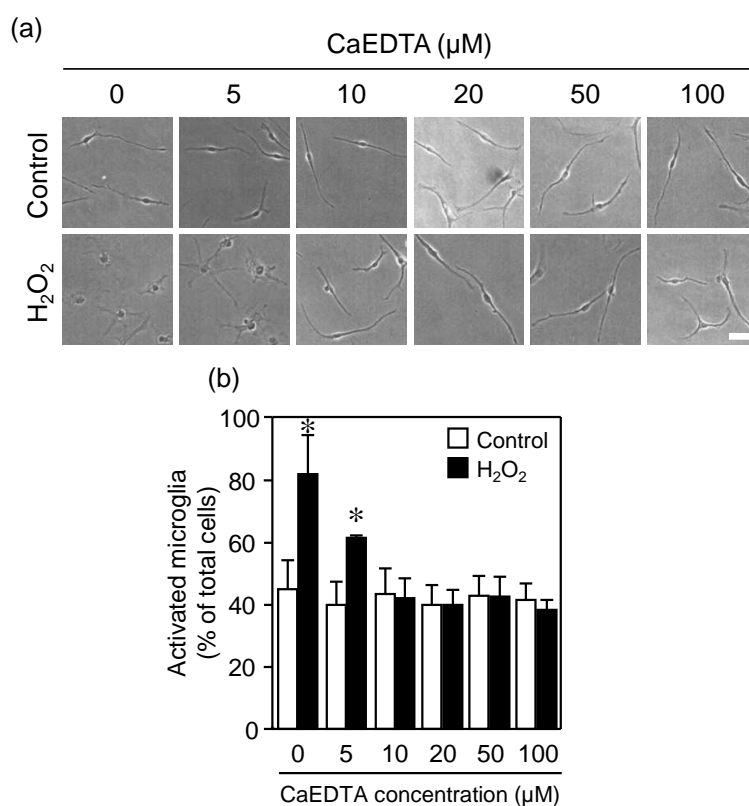
After astrocytes had been incubated with 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence or absence of 2  $\mu\text{M}$  TPEN for the indicated times, their intracellular labile zinc levels were determined. Panel b shows standard curves constructed with 0–5  $\mu\text{M}$  ZnPT for quantification of intracellular labile zinc levels based on the fluorescence intensity of ZnAF-2. Representative photomicrographs and quantitative results for three independent experiments are shown in panels a and c, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p$ <0.05 (vs. respective control). Bar = 40  $\mu\text{m}$ . This figure was cited from Fig. 1 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.



### 3. ACM 処理によるミクログリアの活性化

酸化ストレス負荷によりアストロサイトから細胞外に放出された亜鉛が、ミクログリアの活性化を惹起するか否かを評価した。Control 群の ACM をミクログリアに添加した場合、その形態に変化は認められなかったのに対し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群の ACM 添加はミクログリアの形態を "ameboid" 状に変化させた (Fig. 4a)。このミクログリアの活性化が亜鉛により惹起されたものであることを確認するために、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群の ACM に細胞膜非透過型亜鉛キレートである CaEDTA を予め添加したところ、それは  $10\ \mu\text{M}$  以上の濃度にて抑制された (Fig. 4b)。

これらのことから、酸化ストレス負荷によりアストロサイトから放出された亜鉛は、これまでの報告 (17) と同様に、ミクログリアを活性化させることが判明した。



**Fig. 4. Microglial activation induced by zinc released from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After 10 min-preincubation in BSS, astrocytes were incubated with  $400\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h in a  $\text{CO}_2$  incubator, and then the media were collected as ACM, followed by heat-inactivation. Thereafter, the ACM was administered to microglial cultures, and they were incubated for 2 h in the presence or absence of the indicated concentrations of CaEDTA. Representative photomicrographs and the quantitative results for three independent experiments are shown in panels a and b, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p < 0.05$  (vs. respective control). Bar =  $40\ \mu\text{m}$ . This figure was cited from Fig. S2 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 考 察

本章では、酸化ストレスを負荷されたアストロサイトにおける亜鉛動態を精査した結果、細胞外及び細胞内のいずれにおいても亜鉛レベルが増大し、その変動プロファイルは両コンパートメントにおいて類似したものであることが明らかとなった。

これまで、アストロサイトからの亜鉛放出には亜鉛トランスポーターである zinc transporters (ZnTs) を介した細胞外への輸送、エキソサイトーシスやヘミチャネルを介した細胞外への放出の関与することが報告されている (17, 36)。また、アストロサイトから細胞外に放出された亜鉛は、近傍のミクログリアを活性化させ、細胞傷害性を示す M1 型への誘導を惹起することが示されている (17, 33, 34, 37)。本章においても、酸化ストレス負荷アストロサイトから放出された亜鉛がミクログリアを活性化させるレベルであったことを明らかにしており、これらのことを考え併せると、酸化ストレスが生じる病態時において、アストロサイトは亜鉛をグリオ伝達物質として利用し、ミクログリアの活性化を制御していることが考えられる。

メタロチオネイン-3 (MT-3) はメタロチオネインのアイソフォームの一つであり、それは脳特異的に、そしてアストロサイトにおいて高発現することが知られている (21, 38)。メタロチオネイン 1 分子は、金属-チオール基の配位結合により亜鉛 7 原子と結合することができ、細胞内に存在する亜鉛のほとんどはメタロチオネインに結合している。そして、ROS の産生を介して酸化ストレスが生じることにより、メタロチオネインにおいてジスルフィド結合が形成される際、金属との配位結合が切れることで亜鉛が遊離する (39, 40)。したがって、今回認められた酸化ストレス負荷アストロサイトにおける細胞内遊離型亜鉛の供給源の一つとして MT-3 が考えられる。また、アミロイド  $\beta$  の凝集が発症要因の一つと考えられているアルツハイマー型認知症において、そのリスクファクターである酸化ストレスにより MT からの亜鉛遊離が増加し、アミロイド  $\beta$  の凝集を亢進させることも報告されている (41, 42)。このことから、本章において明らかとなった酸化ストレス負荷による細胞内外の亜鉛動態の変動は、中枢神経系の病態時における亜鉛の関与を考える上で重要な知見であると言える。

また、カチオンチャネルの一つである transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7 (TRPM7) は、酸化ストレス誘発性の神経細胞死に関与すると報告されており、それは強制発現細胞において、酸化ストレスに応答して亜鉛含有小胞から細胞質への亜鉛の放出を介在することが明らかとなっている (43, 44)。アストロサイトにも TRPM7 は発現することから (45)、酸化ストレス負荷アストロサイトの細胞内亜鉛の増大に対して、TRPM7 が関与することが考えられるが、その詳細は現在検討中である。なお、アストロサイトの細胞内における遊離型亜鉛レベル増大の生理的意義は現時点では不明であるが、これについては第 3 章にて示す成績を踏まえて考察する。

病態時の中枢神経系において、アストロサイトは種々の遺伝子発現の増大を伴って活性化状態となり、その機能が変化することが知られており、その生理的役割の一つとして傷害部位周辺において形成されるグリア瘢痕とよばれる物理的かつ機能的なバリアがある。グリア瘢痕は、傷害部位周辺にて GFAP の発現増大を伴った活性化アストロサイトが軸索再生の阻

害因子を発現する一方、傷害部位を正常部位から隔離することで二次的な傷害の拡大を防ぐとされている (46, 47)。また、活性化アストロサイトは神経栄養因子の産生に加えて、グルタミン酸の細胞外からの取り込みを増大させることにより、神経細胞を虚血傷害から守る役割を有することも示唆されている (48, 49)。このように脳傷害発生に伴って活性化するアストロサイトは、脳神経系細胞保護的にも傷害的にも働きうる二面性を有していることから、その機能制御は脳の恒常性を維持する上で重要である。

今回、アストロサイトへの酸化ストレス負荷に用いた  $400\ \mu\text{M}$  の濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  は、その細胞生存率を低下させることなく活性化させ、亜鉛動態を変動させた (Fig. 1)。一方、本条件を神経細胞やミクログリアに処理した場合、それらは酸化ストレスに対して脆弱であるため、いずれにおいても細胞死が誘発されると推測される。そのため、今回用いた実験条件がうつ病などの病態における脳内環境を反映するものではない可能性が考えられる。Figure 1 に示すごとく、 $400\ \mu\text{M}$  の場合と比較して、変化の程度は小さいものの  $100$  及び  $200\ \mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  によってもアストロサイトの形態変化、並びに GFAP 及び 4-HNE の発現増大が認められ、それらは  $\text{H}_2\text{O}_2$  の濃度に依存したものであった。したがって、生体環境を考慮すると  $400\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  は強い酸化ストレスであるものの、本実験条件下において得られた知見は、うつ病などの弱い酸化ストレス負荷状態におけるアストロサイトの機能変化を反映するものと考察される。

## 第2章 細胞外亜鉛クリアランスの変動

### 緒言

第1章の結果から、酸化ストレス負荷されたアストロサイトは細胞外へと亜鉛を放出することが明らかとなり、それはグリオ伝達物質として機能することが判明した。一方、前述のごとく、ミクログリアの過剰な活性化は神経細胞傷害的に機能することから、細胞外に放出された亜鉛は速やかに除去される必要がある。

グルタミン酸は亜鉛と同様に、神経及びグリオ伝達物質として脳機能の維持・発現に重要な役割を担う (2)。グルタミン酸はグルタミン酸作動性神経のシナプス前小胞に貯蔵されており、神経活動に伴ってシナプス間隙に放出され、シナプス後膜上に発現するグルタミン酸受容体を活性化することにより情報を伝達する (50)。その後、グルタミン酸はアストロサイトに発現するグルタミン酸トランスポーター **GLAST** を介して取り込まれ、グルタミンに変換後、グルタミントランスポーターを介して神経細胞に供給され、グルタミン酸として再利用される (50)。グルタミン酸も亜鉛と同様に、細胞外濃度が過剰となることで神経細胞に対して毒性を示す。これに対して、アストロサイトは酸化ストレス負荷時において **GLAST** の発現を増大させ、細胞外グルタミン酸のクリアランスを亢進させることにより、神経細胞の過剰興奮に対して保護的に機能する (49)。これらのことと、亜鉛がグルタミン酸と共にグルタミン酸作動性神経のシナプス前小胞から情報伝達物質として放出されることを考え併せると、細胞外亜鉛のクリアランスにアストロサイトが重要な役割を担うことは容易に推測される。

実際にアストロサイトは、脳神経系細胞外の亜鉛クリアランスに関与する主要な細胞であり、それは亜鉛トランスポーター群を介したものであることが報告されている (28)。亜鉛トランスポーターとしては **Zrt-/Irt-like proteins (ZIPs)** 及び **ZnTs** が知られており、アストロサイトによる亜鉛の細胞外からの取り込みは、高親和性及び低親和性コンポーネントの少なくとも2つのコンポーネントによって介在され、後者は **ZIP1** であることが明らかにされている (51, 52)。そのため、**ZIP** を介した細胞外亜鉛の制御機構を解明することは、病態時における亜鉛の恒常性維持を考える上で重要であるものの、酸化ストレス負荷条件下においてアストロサイトによる亜鉛クリアランスが変動するか否かは不明である。

そこで本章では、酸化ストレス負荷されたアストロサイトによる亜鉛の取り込み特性について精査した。

## 実験材料及び方法

### 1. 試薬

$^{65}\text{Zn}$  radionuclide-HCl (20 MBq/mL) は、独立行政法人理化学研究所から購入した。bromophenol blue はナカライテスクから、O, O'-bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) 及び Hoechst 33258 は同仁化学から購入した。aprotinin 及び sodium orthovanadate は Sigma-Aldrich から、pepstatin 及び leupeptin はペプチド研究所から購入した。phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) は Cell Signaling Technology より購入した。その他の試薬は和光純薬工業から購入し、第 1 章実験材料及び方法 1 項に準じていずれも特級若しくはそれ以上の規格のものをを用いた。

### 2. マウス大脳皮質アストロサイトの培養

マウス大脳皮質アストロサイトの初代培養は、第 1 章実験材料及び方法 2 項と同様に行った。

### 3. $\text{H}_2\text{O}_2$ 処理

$\text{H}_2\text{O}_2$  処理は第 1 章実験材料及び方法 3 項と同様に行った。

### 4. 取り込み実験

$^{65}\text{Zn}$  取り込み実験は、 $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -free HEPES-HBSS を実験緩衝液として用いて行った。基質取り込みは、細胞を緩衝液中にて 10 分間プレインキュベーションした後、放射性基質 50 nM  $\text{ZnCl}_2$  (0.25 nM  $^{65}\text{ZnCl}_2$  + 50 nM  $\text{ZnCl}_2$ ) を添加することにより開始し、一定時間経過後、氷冷 HEPES-HBSS を加えることで反応を停止し、濃度依存的  $^{65}\text{Zn}$  取り込み実験の場合、細胞をプレインキュベーションの後、指示された濃度の  $^{65}\text{ZnCl}_2$  (0.5 nM  $^{65}\text{ZnCl}_2$  + 0.5~30  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ) を 1 分間作用させた。反応停止後、細胞に水を添加し、細胞を破壊することにより測定用試料を調製した。細胞内の  $^{65}\text{Zn}$  濃度は、その放射活性をガンマカウンタ (1480 WIZARD<sup>3</sup>; PerkinElmer) を用いて算出し、取り込み値は各 well 毎のタンパク質濃度で補正した。

### 5. 速度論的解析

亜鉛取り込みの速度論パラメータは、基質濃度依存的実験の結果を基に、非線形最小二乗法プログラム MULTI (53) を用いて Eadie-Hofstee の式 ① により算出した。

$$v / [S] = - v / K_m + V_{\max} / K_m \quad \text{①}$$

なお、[S] は基質濃度、 $K_m$  は Michaelis 定数、 $v$  は初期取り込み速度並びに  $V_{\max}$  は最大取り込み速度をそれぞれ示す。

### 6. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

培養アストロサイトの total RNA は、GeneElute<sup>TM</sup> Mammalian Total RNA Mini prep kit

(Sigma-Aldrich) を用いて抽出した後、PrimeScript™ reverse transcription reagent kit (TaKaRa) により逆転写し、cDNA を得た。得られた cDNA は SYBR® Primix EX Taq (TaKaRa) を用い、ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) により PCR 反応を行った。各サンプルの mRNA 発現量は  $\beta$ -actin の mRNA 発現量にて補正した。なお、ZIPs 及び ZnTs の検出に用いたプライマーの塩基配列は Table 1 に示した。

**Table 1. Specific primer sets used for real-time PCR amplification of ZIPs and ZnTs.**

Gene	Accession number		Primer sequences	Product size
ZIP1	NM_013901	Forward	5'-TTGGCTACATGTCTTCTGGACCTG-3'	177 bp
		Reverse	5'-TGGACTGGTCTGTTCCCTTGTAAAGC-3'	
ZIP2	NM_001039676	Forward	5'-TAAGGGAAATTCCTCTCGTGATGC-3'	159 bp
		Reverse	5'-TCCTCTTCCTGTACTGTCGATCCTC-3'	
ZIP3	NM_134135	Forward	5'-ACCGCTCCAAGAAGGTCCTG-3'	201 bp
		Reverse	5'-CAGCTGCTCCACGAACACAG-3'	
ZIP4	NM_028064	Forward	5'-TTGGAGGCTTCTACATCTTCTTCC-3'	124 bp
		Reverse	5'-AGAGATATCCATGGCTGTGC-3'	
ZIP5	NM_001136237	Forward	5'-TCCAGTGGCCTCAGCACTA-3'	107 b bp
		Reverse	5'-AGCAGCTTCCGAAAGGATAAC-3'	
ZIP6	NM_139143	Forward	5'-ATGGCAACAGGGATATTCATCG-3'	132 bp
		Reverse	5'-ACTAGCATCATTGTGCAACATCTC-3'	
ZIP8	NM_001135149	Forward	5'-CCATAGCGATCCTGTGTGAGG-3'	115 bp
		Reverse	5'-AACACGCGGAGAGGAAGTTG-3'	
ZIP10	NM_172653	Forward	5'-TCAGTATGCCAACAACATCACA-3'	97 bp
		Reverse	5'-ATGATGGCGAATCCAAACAG-3'	
ZIP12	NM_001012305	Forward	5'-AATGTGCCAGCCTCCAACA-3'	100 bp
		Reverse	5'-TTACTAGGCCATCTGCAAAATTGTG-3'	
ZIP14	NM_00135151	Forward	5'-TCAACTTCCTCTCTGCCTGCTG-3'	187 bp
		Reverse	5'-ATAATGGAGAAGCCGGTTAGG-3'	
ZnT1	NM_009579	Forward	5'-ACCAGGAGGAGACCAACACG-3'	160 bp
		Reverse	5'-TTGTCTTCCGCTTCCAGATTG-3'	
ZnT2	NM_001039677	Forward	5'-ATTAGCCTCTTCGCCCTCTG-3'	180 bp
		Reverse	5'-ACATGGTGTCCCTTTGATCTC-3'	
ZnT5	NM_022885	Forward	5'-TCTCCTGAAGGAACACCACTCTATC-3'	215 bp
		Reverse	5'-AGCACGCCATAGAACAACCTCC-3'	
ZnT6	NM_001252478	Forward	5'-TCCGTTTGTCTTGATTGATCTTGC-3'	133 bp
		Reverse	5'-ATGGTGCCAAACGTCATCAG-3'	
ZnT7	NM_023214	Forward	5'-AAGTCCTGGCTGGCTTTGTC-3'	121 bp
		Reverse	5'-AAGCAGCAGTCTCTCGTGGTG-3'	
ZnT8	NM_172816	Forward	5'-ACAGGTCGAGCAAGCAAGC-3'	216 bp
		Reverse	5'-ATGTCAGCCGCTTGGAAGG-3'	
$\beta$ -actin	NM_007393	Forward	5'-AGGTCATCACTATTGGCAACGA-3'	171 bp
		Reverse	5'-CACTTCATGATGGAATTGAATGTAGTT-3'	

This table was cited from Table 1 in *Life Sci.*, **2016**, 151, 305-312.

## 7. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

### 7-1. タンパク質抽出

培養細胞を PBS で 2 回洗浄した後、PBS 中にて CELL LIFTER (Corning) を用いて細胞を回収し、4°C、20800×g で 5 分間の遠心分離を行った。得られた細胞塊に対して、適量の extraction buffer (10 mM HEPES, 1 mM dithiothreitol (DTT), 4 mM EGTA, 320 mM sucrose, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP), 10 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL pepstatin, 5 µg/mL

leupeptin, 5 mM benzamidine, 1 mM sodium orthovanadate, pH 7.4) を加え、超音波処理により細胞を破碎し、細胞懸濁液を調製した。得られた細胞懸濁液のタンパク質濃度は coomassie brilliant blue (CBB) 法により測定し、タンパク質濃度が 2 mg/mL となるように extraction buffer で調製した。その後、同量の Laemmli sample buffer (250 mM Tris-HCl, 2% SDS, 30% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を加えることで最終タンパク質濃度を 1 mg/mL とし、95°C、5 分間の熱変性を行ったものをサンプルとした。

## 7-2. 細胞膜及び細胞質の分画

細胞分画には Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。培養細胞を PBS で 2 回洗浄した後、trypsin-EDTA (GIBCO) 含有 PBS を用いて細胞を剥離し、4°C、300×g で 5 分間遠心分離した。得られた細胞塊に対し、5 mL の PBS を加え、細胞数を計測した。細胞数  $5 \times 10^6$  cells に対して 3 mL の wash buffer を加え、懸濁洗浄後に再度 4°C、300×g で 5 分間の遠心分離を行った。上澄を取り除き、再び 1.5 mL の wash buffer を加えて 4°C、300×g で 5 分間遠心分離し、得られた細胞塊に対して 0.75 mL の permeabilization buffer を加えた。その後、4°C で 10 分間振とう攪拌させ、4°C、16000×g、15 分の遠心分離を行った。得られた細胞上澄を回収し、細胞質画分とした。残った細胞塊に対し solubilization buffer を 0.5 mL 加え、4°C、30 分間の振とう攪拌を行い、その後 4°C、16000×g で 15 分間遠心分離した。このとき得られた細胞上澄を回収し、細胞膜画分とした。得られた細胞膜及び細胞質画分のタンパク質濃度を CBB 法により定量し、同量の Laemmli sample buffer を加え、95°C、5 分間熱変性したものをサンプルとした。

## 7-3. 電気泳動

抽出したタンパク質サンプルを 7.5% polyacrylamide gel に添加し、electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) を用いて SDS-PAGE を行った。その後、blotting buffer (100 mM Tris, 192 mM glycine) と methanol の混合液 (95:5) で処理した polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon; Millipore) に 2 時間転写し、0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) にて洗浄後、0.05% sodium azide 添加 5% skim milk (Difco) 中にて 60 分間ブロッキングした。一次抗体には rabbit anti-ZIP1 (1:100, catalogue number: ZIP11-A, Alpha Diagnostic), mouse anti-β-actin (1:1000, catalogue number: A5316, Sigma-Aldrich), rabbit anti-sodium potassium ATPase beta 1 (ATP1B1; 1:2000, catalogue number: GTX113390, GeneTex) 抗体を用い、ブロッキング処理した PVDF 膜と 4°C で一晩作用させた。二次抗体は PBS により調製した anti-rabbit (1:10000, catalogue number: PI-1000, Vector Laboratories) または anti-mouse (1:10000, catalogue number: PI-2000, Vector Laboratories) IgG HRP-linked 抗体を室温にて 60 分間作用させた。タンパク質発現量の定量解析は、検出されたバンド強度を Image J software (ver. 1.45; National Institutes of Health) により測定し、β-actin または ATP1B1 のバンド強度にて補正した。

## 8. 免疫細胞染色

第 1 章実験材料及び方法 4 項と同様に行った。核は Hoechst 33258 (2 µg/mL) にて染色した。

なお、使用した一次抗体は mouse anti-pan cadherin (1:200, catalogue number: ab6528, Abcam) 及び rabbit anti-ZIP1 (1:250, catalogue number: ZIP11-A)、二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit (1:1000, catalogue number: A11008, Thermo Fisher Scientific) 及び Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse (1:1000, catalogue number: A11030, Thermo Fisher Scientific) 抗体を用いた。抗体の希釈には Can Get Signal<sup>®</sup> Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A (TOYOBO) を用いた。

## 9. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値 $\pm$ S.D. にて表示した。有意差検定は Ohishi らの報告に基づき (35)、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、2 群間比較には Student's t-test を、多群間比較には 2 元配置分散分析 (Tukey's test) を適用し、得られた  $p$  値が 0.05 未満 (両側) の場合を有意差ありとした。

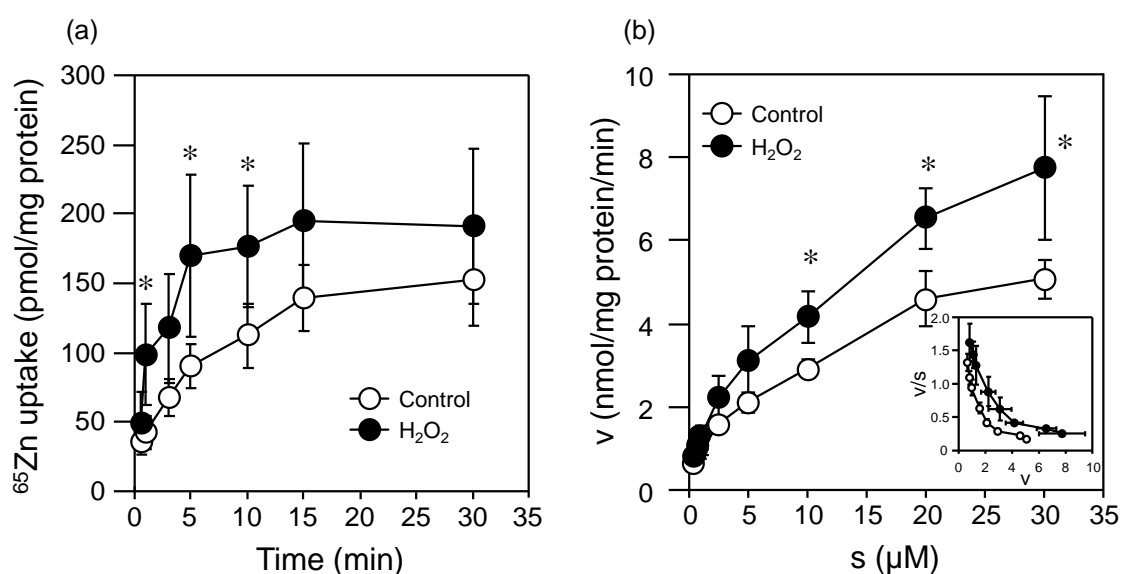


## 実験成績

### 1. $^{65}\text{Zn}$ の取り込み特性

酸化ストレス負荷がアストロサイトによる亜鉛取り込みに与える影響を評価するため、 $^{65}\text{Zn}$  を基質とした取り込み特性を評価した。アストロサイトによる  $^{65}\text{Zn}$  の取り込みは、control 及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群のいずれにおいても時間の経過とともに増大し、約 5 分で定常状態に達した (Fig. 5a)。この取り込みを両群間で比較すると、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理されたアストロサイトの方が反応開始後 10 分まで有意に高かった。

$^{65}\text{Zn}$  取り込みの基質濃度依存性を評価した結果を Fig. 5b に示す。アストロサイトによる  $^{65}\text{Zn}$  取り込みは、5  $\mu\text{M}$  以上の基質濃度において飽和傾向を示したが、10  $\mu\text{M}$  以上における  $^{65}\text{Zn}$  の初期取り込み速度は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群の方が control 群におけるそれよりも有意に大きかった。この結果に基づいて Eadie-Hofstee plot を作製し、それにより算出した Michaelis 定数 ( $K_m$ ) 及び最大初期取り込み速度 ( $V_{\max}$ ) の推定値を Table 2 に示す。 $^{65}\text{Zn}$  取り込みに関する高親和性コンポーネントの  $K_{m1}$  及び  $V_{\max1}$  は、control 及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群でほぼ同値であった。低親和性コンポーネントに関して、その  $K_{m2}$  値は、既知の ZIP1 のそれ (約 6  $\mu\text{M}$ ) (52) とほぼ等しく、両群間で差はなかったが、 $V_{\max2}$  は control 群 (2848 pmol/mg protein per min) と比較して、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群 (5405 pmol/mg protein per min) で有意に高かった。これらの結果より、アストロサイトによる亜鉛取り込みは酸化ストレス負荷により増大し、これは少なくとも一部、ZIP1 の発現増大を介したものである可能性が示唆された。



**Fig. 5. Time- and concentration-dependent  $^{65}\text{Zn}$  uptake by  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been treated with 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h, they were used for  $^{65}\text{Zn}$  uptake assay. Time- and concentration-dependent  $^{65}\text{Zn}$  uptake are shown in panels a and b, respectively. The Eadie-Hofstee plots for the concentration-dependent  $^{65}\text{Zn}$  uptake are shown in the inset of panel b. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (control: N = 6,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : N = 3 in panel a; control: N = 3,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : N = 4 in panel b). \* $p$  < 0.05 (vs. respective control). This figure was cited from Fig. 2 in *Life Sci.* **2016**, 151, 305-312.

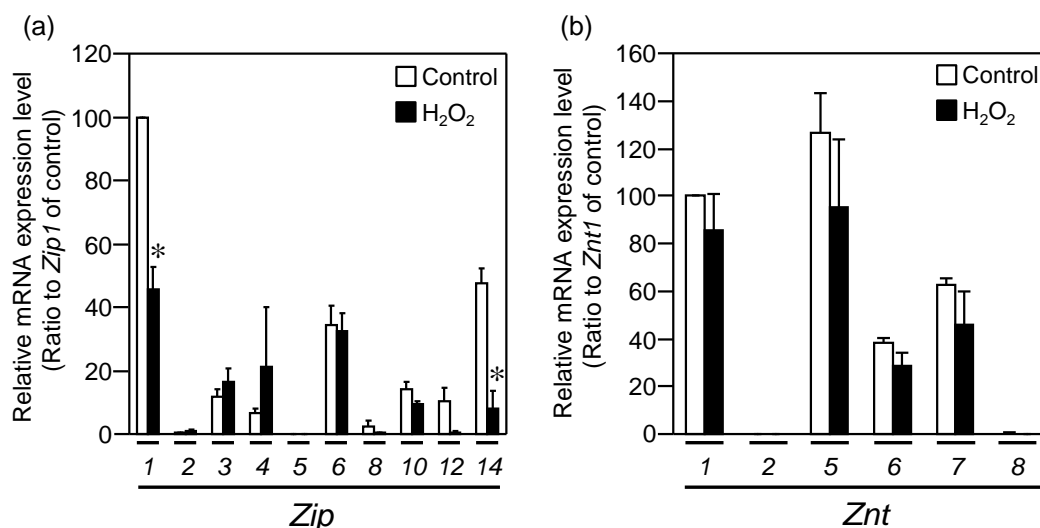
**Table 2. Kinetic constants for  $^{65}\text{Zn}$  uptake by  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

	Control	$\text{H}_2\text{O}_2$
$K_m1$ ( $\mu\text{M}$ )	$0.992 \pm 0.434$	$1.27 \pm 0.64$
$K_m2$ ( $\mu\text{M}$ )	$14.1 \pm 7.8$	$11.3 \pm 3.5$
$V_{\max}1$ (pmol/mg protein/min)	$2456 \pm 202$	$4175 \pm 1079$
$V_{\max}2$ (pmol/mg protein/min)	$2848 \pm 297$	$5405 \pm 724^*$

The kinetic constants were calculated on the basis of the Eadie–Hofstee equation using the data shown in Fig. 5b. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (control: N = 3,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : N = 4).  $^*p < 0.05$  (vs. control). This table was cited from Table 2 in *Life Sci.*, **2016**, 151, 305-312.

## 2. ZIPs 及び ZnTs の mRNA 発現減少

アストロサイトによる亜鉛取り込みに関与すると考えられる亜鉛トランスポーター群の発現が、酸化ストレス負荷により変動するか否かを検討した。本検討では、細胞膜上に発現すると報告されている ZIP1、2、3、4、5、6、8、10、12 及び 14、並びに ZnT1、2、5、6、7 及び 8 の発現量を評価した (51)。Figure 6a に示すように、アストロサイトにおいて、ZIP1 の発現が最も多く、次いで ZIP14 であり、ZIP3、4、6、8、10 及び 12 の発現も検出され、このプロファイルは過去の報告と一致したものであった (28)。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理されたアストロサイトでは、ZIP1 及び 14 の発現が顕著に低下しており、他のアイソフォームの発現には変化なかった。ZnTs に関しては、ZnT1、5、6 及び 7 の発現がアストロサイトにおいて認められたものの、それら発現量は control 及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群間で差はなかった (Fig. 6b)

**Fig. 6. Expression profiles of mRNAs for ZIPs and ZnTs in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been treated with 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h, their total RNA was obtained. mRNA expression for *Zip* and *Znt* are shown in panels a and b, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3).  $^*p < 0.05$  (vs. respective control). This figure was cited from Fig. 3 in *Life Sci.* **2016**, 151, 305-312.

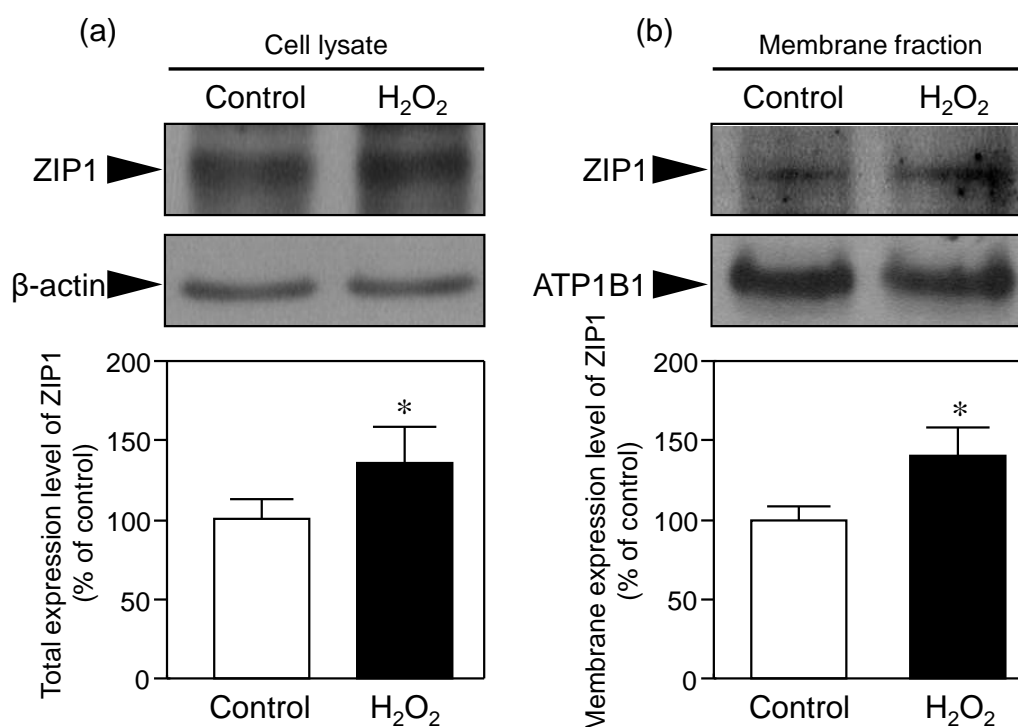
### 3. ZIP1 タンパク質発現の増大

ZIP1 がアストロサイトに発現する主要な ZIP アイソフォームの一つであること、並びに酸化ストレス負荷されたアストロサイトによる ZIP1 を介した亜鉛取り込みの最大取り込み速度 ( $V_{\max 2}$ ) が有意に増加していたことから、アストロサイトにおける ZIP1 の発現が酸化ストレス負荷により増大している可能性が考えられた。そこで、control 及び  $H_2O_2$  処理群の ZIP1 タンパク質発現量を比較した。

ZIP1 の免疫活性は 34 kDa 付近に認められ、細胞及び細胞膜画分のいずれにおいてもその免疫活性は control 群と比較して  $H_2O_2$  処理群において有意に強かった (Fig. 7a, b)。

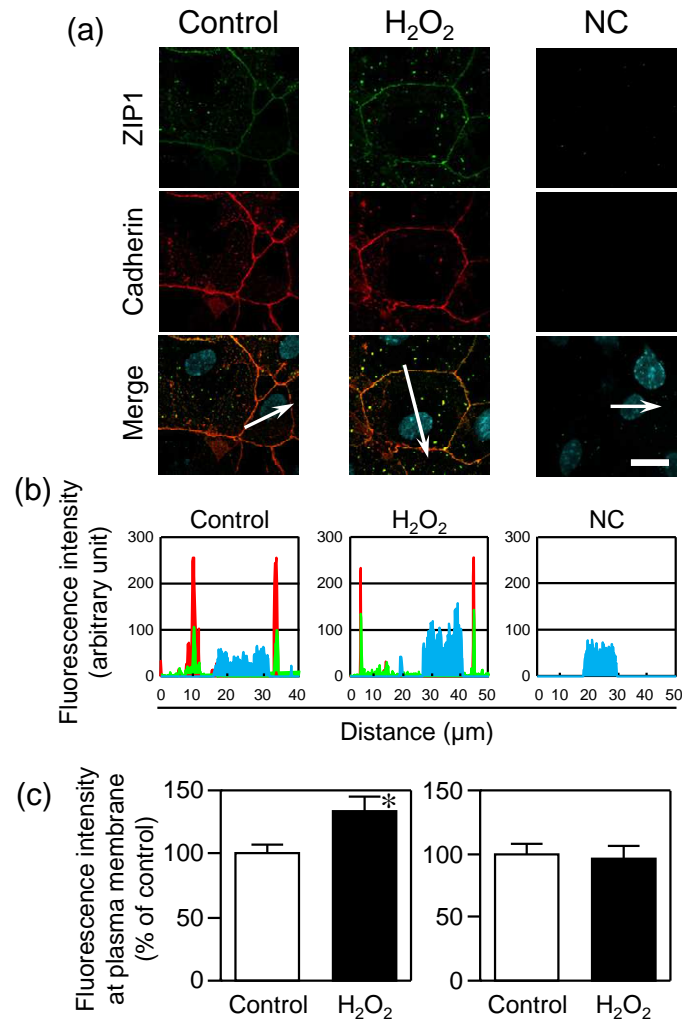
このことをより明確に示すため、免疫細胞染色により、ZIP1 のアストロサイトにおける発現局在を調べた (Fig. 8)。Control 及び  $H_2O_2$  処理群のいずれにおいても、ZIP1 の免疫活性はカドヘリンの免疫活性によって示される細胞膜において検出されたが、その蛍光強度は後者のほうが強い傾向にあった (Fig. 8a)。そこで、この蛍光強度をスペクトラム解析し (Fig. 8b)、定量化したところ、 $H_2O_2$  処理群における ZIP1 の蛍光強度は control 群のそれよりも約 1.5 倍高く (Fig. 8b, c)、これは Fig. 7b に示したウェスタンブロットの結果と一致するものであった。

これらのことから、アストロサイトの細胞膜上における ZIP1 の発現は、酸化ストレス負荷により増加することが判明した。



**Fig. 7. Up-regulation of ZIP1 expression at plasma membrane in  $H_2O_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with 400  $\mu M$   $H_2O_2$  for 24 h, cell lysate (a) and membrane fraction (b) were obtained. The expression levels of ZIP1 were normalized as to those of  $\beta$ -actin or ATP1B1. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 4 in panel a, N = 3 in panel b). \* $p$  < 0.05 (vs. each control). This figure was cited from Fig. 4 in *Life Sci.* **2016**, 151, 305-312.



**Fig. 8. Cellular localization of ZIP1 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with 400 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h, they were subjected to immunocytochemical analysis. The immunoreactivities of ZIP1 and cadherin were detected as green and red, respectively. Representative photomicrographs (a) and representative fluorescence intensity-distance profiles along the arrows in panel a (b) for three independent experiments are shown. Panel c shows the ratios of the fluorescence intensity at the plasma membrane to that in the control. A negative control (NC) was performed by omitting the 1<sup>st</sup> antibodies to confirm specificity of the immunoreactivity. Each column represents the mean ± S.D. (N = 3 in panel c). \**p* < 0.05 (vs. control). Scale bar = 20 μm. This figure was cited from Fig. 5 in *Life Sci.* **2016**, 151, 305-312.

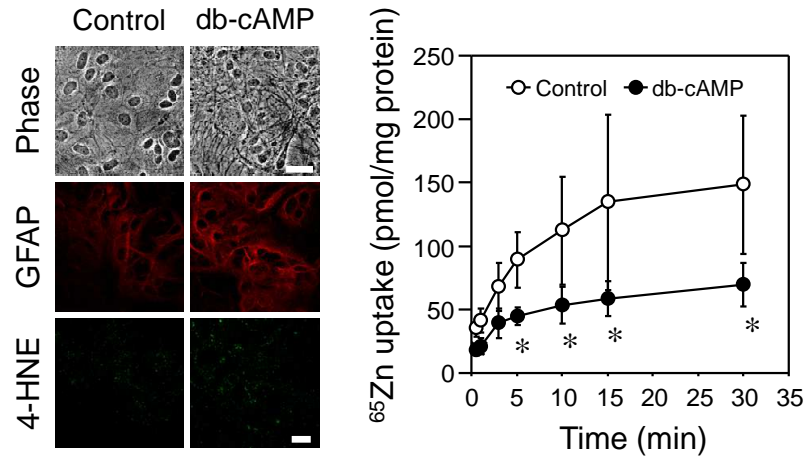
## 考 察

本章では、酸化ストレス負荷によってアストロサイトの亜鉛取り込み活性が増大し、これは少なくとも一部、細胞膜上における ZIP1 の発現増大に起因することが示された。

このアストロサイトによる亜鉛クリアランスの増大は、酸化ストレス負荷によって増大した細胞外亜鉛による神経毒性に対して、保護的な役割を果たすと考えられる。前述のごとく、虚血などの酸化ストレスが生じた際の脳神経系細胞外の亜鉛レベルは、二相性に上昇するが (19, 20)、このうち慢性期 (6~36 時間) に増大する細胞外亜鉛は、ミクログリアを活性化することにより、神経傷害を増悪させる (17, 33, 34, 37)。したがって、今回認められた酸化ストレス負荷アストロサイトにおける ZIP1 の発現増大は、慢性期における細胞外亜鉛レベルを低下させることでミクログリアの活性化を抑制し、また、グリア瘢痕を形成することで、脳傷害の拡大を防ぐ役割を担うと推察される。

脳神経系細胞は、酸化ストレスの発生を伴う虚血に対して脆弱であるが、細胞死を生じない程度の虚血により、その後の細胞傷害的な虚血に対する耐性を生じる。これはプレコンディショニング現象とよばれるが (54)、近年 Hirayama らは、このプレコンディショニングにアストロサイトの活性化が必須であることを明らかにしたものの (55)、その詳細なメカニズムは不明である。一方 Lee らは、細胞に傷害を与えない程度の亜鉛を大脳皮質培養切片に 24 時間暴露することで、亜鉛により惹起される神経細胞死は減少し、その大部分が細胞膜非透過型亜鉛キレートである CaEDTA により抑制されることを報告している (56)。このことから著者は、亜鉛による神経細胞保護作用には神経細胞における緩やかな亜鉛の貯留が重要であると考え。すなわち、今回明らかとなった細胞傷害を生じない程度の酸化ストレス負荷は、アストロサイトを活性化すると共に亜鉛取り込みを増大させたが、これは細胞傷害的なストレスによる過度の細胞外亜鉛レベルの上昇を速やかに低下させることにより、神経細胞による亜鉛取り込み量を減少させ、その細胞内亜鉛レベルの上昇を穏やかにし、細胞傷害に対する耐性を付与するというものである。

これまで活性化アストロサイトの培養には、細胞への cyclic AMP (実際にはその細胞膜透過型である dibutyryl-cyclic AMP (db-cAMP)) の添加が広く用いられてきた (49)。そこで、今回認められた活性化アストロサイトにおける亜鉛取り込みが普遍的なものであるか否かを検証するために、アストロサイトを db-cAMP により活性化させ、その亜鉛取り込みを評価した。Figure 9 に示すように、db-cAMP 処理によりアストロサイトはその形態を変化させると共に、GFAP の発現が増大した活性化状態となったものの、4-HNE によって示される酸化ストレスは伴っていなかった。このアストロサイトによる亜鉛取り込みは、control 群のそれよりも有意に低く、酸化ストレス負荷の場合と異なっていた。この相反する機能変化の詳細は不明であるが、本成績は適切に病態を反映する条件下において実験を行うことの重要性を明確に指摘するものである。



**Fig. 9. Time-dependent <sup>65</sup>Zn uptake by db-cAMP-treated astrocytes.**

(a) After astrocytes had been treated with 0.15 mM db-cAMP for 72 h, they were subjected to immunocytochemical analysis. Panel a shows astrocytic morphology, and the immunoreactivities of GFAP and 4-HNE were detected as red and green, respectively. Bar = 40 μm. (b) After treatment of 0.15 mM db-cAMP for 72 h, astrocytes were used for time-dependent <sup>65</sup>Zn uptake assay. Each point represents the mean ± S.D. (control: N = 7, db-cAMP: N = 5). \**p* < 0.05 (vs. respective control).

酸化ストレス負荷アストロサイトにおける ZIP1 タンパク質の発現増大は、mRNA レベルでの変動を反映したものではなかった。一般的に、タンパク質発現量はその遺伝子の転写・翻訳及び分解のバランスによって決定される。したがって、酸化ストレス負荷によるアストロサイトでの ZIP1 タンパク質発現量の増大は、そのタンパク質の安定化が、mRNA の減少を上回ったことによる可能性が考えられる。これまでに、ZIP1 の細胞膜発現は細胞内亜鉛レベルによって制御されることが報告されており (57)、この膜発現局在の変動には、リソソームやゴルジ体といった細胞内小器官への内部移行及び分解経路が関与している。また、ZIP1 のアミノ酸残基の変異はそのタンパク質分解を抑制し、細胞膜発現を増加させることも明らかになっている (57, 58)。これに加え、第 1 章において、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの細胞内亜鉛レベルは、2 時間を最大として増大するものの、その後 24 時間まで減少するという時間の推移に伴った変動が明らかになったことを考え併せると、酸化ストレス負荷によるアストロサイト細胞内亜鉛動態の変動が転写・翻訳並びに分解系を変化させ、これにより細胞膜における ZIP1 の発現が増大した可能性が考えられる。

また、タンパク質及び mRNA レベルの相反する変動が転写と翻訳を評価する時間ポイントの問題に起因する可能性もある。すなわち、酸化ストレス負荷に対応してアストロサイトにおける ZIP1 遺伝子の転写がその負荷後 24 時間より以前に一過性に亢進し、その mRNA 発現量が増加するが、ネガティブフィードバック機構などを介してその後低下する。一方、ZIP1 タンパク質は一過性の mRNA の増加に対応するものの、遅れて発現量が増加したために、mRNA 量とタンパク質が対応しなかった可能性である。本章にて行った ZIP1 の発現変動評価は、mRNA 及びタンパク質レベルのいずれも酸化ストレス負荷後 24 時間でのみ定量しており、その前後の時間における変動は検討できていないため、この矛盾する結果については今後のより詳細な検討が望まれる。

### 第3章 細胞内亜鉛による食食活性制御

#### 緒言

ATP は普遍的な細胞のエネルギー源であるが、神経及びグリア細胞間における情報伝達物質としての役割も有することが近年明らかとなってきた (59)。ATP による細胞間情報伝達は受容体を介しており、神経細胞の興奮伝達は、シナプス前神経細胞から放出された ATP がシナプス後膜に発現するプリン受容体 (P2R) を活性化することによって行われる。また、一部の P2R はシナプス前神経細胞にも発現し、興奮伝達を制御する (60, 61)。P2R の一つである P2X7R は ATP に対する感受性が低く、その活性化は 900 Da 程度の物質輸送に関与するチャネル/ポアを形成し、神経細胞でのその活性化は細胞死を惹起する (35, 62-66)。これに対して、アストロサイトでは、オートクリン/パラクリン的に放出された ATP 刺激により、P2X7R は恒常的に活性化しており、それはアストロサイトの食食活性を制御している (67-69)。

これまでに、うつ病患者の死後脳を用いた検討において、P2X7R の発現増大が報告されており (70)、また、うつ病を含む気分障害の発症には、P2X7R 遺伝子の一塩基多型 (SNP; single nucleotide polymorphism) による受容体機能の低下が寄与することも示唆されている (71, 72)。さらに、社会的敗北ストレスによるうつ病モデル動物において、そのうつ様行動の発症には脳の細胞外 ATP の減少が関与すること、並びにこれはアストロサイトからの ATP 放出の減少に起因することが報告されている (73)。一方、慢性的軽度ストレス負荷によるうつ病モデルマウスにおいて、微小透析法を用いて測定した脳細胞外 ATP は増加することも明らかにされている (74)。しかしながら、うつ病の発症原因の一つである酸化ストレスの負荷によって、アストロサイトにおける P2X7R の機能的発現が変動するか、また、それによって制御される食食機能が影響されるかは不明である。

亜鉛及び ATP どちらも中枢における重要な情報伝達物質であるものの、これまでに、細胞内外の亜鉛動態の変動と ATP シグナリングとの連関についての研究はほとんどなされていない。著者の研究室では、前述した亜鉛によるミクログリアの活性化が、細胞外亜鉛の ZIP1 によるミクログリア細胞内への取り込みに続いた ATP の細胞外への放出、そしてそれによるオートクリン/パラクリン的な P2X7R の活性化を介したものであることを明らかにしている (28, 33, 34)。このことは、アストロサイトにおいても細胞内における亜鉛レベルの増大が ATP-P2X7R シグナリングを制御する可能性を示している。

そこで、第3章では酸化ストレス負荷によるアストロサイト細胞内における遊離型亜鉛レベルの増大が P2X7R の機能的発現、さらにはその食食活性に及ぼす影響を精査した。

## 実験材料及び方法

### 1. 試薬

YO-PRO-1 (YP) は Invitrogen から、yellow-green carboxylate latex beads (bead) は Polysciences から、ATP 及び oxidized ATP (oxATP) は Sigma-Aldrich から購入した。A438079 は Tocris から、CBB G-250 はナカライテスクから、trypan blue 及び ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA) は同仁化学から購入した。その他の試薬は和光純薬工業から購入し、第 1 章実験材料及び方法 1 項に準じていずれも特級若しくはそれ以上の規格のものを用了。

### 2. マウス大脳皮質アストロサイトの培養

マウス大脳皮質アストロサイトの初代培養は、第 1 章実験材料及び方法 2 項と同様に行った。

### 3. HEK293T 細胞の培養

HEK293T 細胞 (大阪大学 片山泰一教授から恵与) は 10% FBS 含有 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; 日水製薬) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 気流下にて培養し、以下に示すように継代した。なお、DMEM は高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) を行った後、L-glutamine、NaHCO<sub>3</sub> 及び非動化处理済み (56°C, 20 分) FBS を最終濃度がそれぞれ 0.584 g/L、0.06% 及び 10% になるように加えた。細胞を PBS で洗浄した後、trypsin-EDTA 含有 PBS を添加し、細胞を回収した。細胞懸濁液に 10% FBS 含有 DMEM を添加することにより trypsin-EDTA の反応を停止させ、4°C、1750×g、5 分間の遠心分離を行った。回収した細胞は適量の 10% FBS 含有 DMEM により再懸濁し、生細胞数を trypan blue 色素排除試験により計数した (75)。その後、細胞は  $6.4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で polyethleneimine (PEI; Sigma-Aldrich) コーティングした 24 well cell culture plate に播種し、1-2 日後に実験に用いた。

### 4. HEK293T/ mP2X7R 細胞の培養

マウス P2X7R full length の安定発現細胞は、ダナフォーム社から購入した mP2X7/pBluescript KS (+) を鋳型とし、QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて抽出した pcDNA3.1/Zeo (+) /mP2X7R を lipofection 法により遺伝子導入することにより作製した (35)。DNA (1.6 µg/cm<sup>2</sup>) を Lipofectamine™ 2000 (1 µL/cm<sup>2</sup>; Invitrogen) を含む OPTI-MEM (50 µL/cm<sup>2</sup>; GIBCO) に希釈し 20 分間室温にて静置した。DNA-liposome 複合体を形成させた後、80% コンフルエントとなった HEK293T 細胞に 6 時間作用させた。その後、培地を 400 µg/mL zeocin (Invitrogen) を含む 10% FBS-DMEM に置き換え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 気流下で培養した。培養継続後、形成された細胞コロニーを採取し、400 µg/mL zeocin を含む 10% FBS-DMEM 中にて再び培養することでセレクションを繰り返した。得られた安定発現細胞については 200 µg/mL zeocin を含む 10% FBS-DMEM 中で継代培養を行った。これ以後は、マウス P2X7R を安定発現した HEK293T 細胞を HEK293T/ mP2X7R 細胞と表記する。



## 5. mP2X7R splice variant-3 及び-4 cDNA の導入

プラスミド DNA (pcDNA3.1/P2X7R splice variant-3 (P2X7R-v3)、pcDNA3.1/HA-tagged P2X7R splice variant-3 (HA-v3)、pcDNA3.1/HA-tagged P2X7R splice variant-4 (HA-v4) 及び pcDNA3.1 (mock)) は QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて抽出し (76)、HEK293T 細胞に対する遺伝子導入には lipofection 法を用いた (35)。方法は安定発現細胞の作製と同様に行い、DNA-liposome 複合体の細胞への添加 6 時間経過後に penicillin/streptomycin (GIBCO) を含む 10% FBS-DMEM に置き換えた。その後、48 時間の培養を行い、各実験に用いた。

## 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理は第 1 章実験材料及び方法 3 項と同様に行った。

## 7. P2X7R のチャネル/ポア活性の評価

P2X7R 活性は蛍光色素 YP の細胞内取り込みにより評価した。指示された条件で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理されたアストロサイトに対し、1  $\mu$ M の YP を一定時間反応させ、BSS を添加することによって反応を停止させた。YP の取り込みの評価は、蛍光顕微鏡を用いて撮影したデジタル画像の蛍光強度を Adpbe Photoshop®を用いて定量することにより行った (67)。

## 8. アストロサイトの食食活性の評価

アストロサイトの食食活性は、bead の細胞内への取り込みにより評価した (68)。指示条件で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理されたアストロサイトに対し、1  $\mu$ L/well の bead を作用させ、一定時間経過した後、BSS にて細胞を洗浄することにより反応を停止し、4% PFA (4°C, 15 分間) で固定した。核は 5  $\mu$ M propidium iodide (PI) により染色した。Bead の取り込みは共焦点レーザー顕微鏡 LSM 800 により得た画像を基に、視野中の bead を計数することによって行った。

## 9. Real-time PCR

P2X7R 及びその splice variants の mRNA 発現は、第 2 章実験材料及び方法 6 項と同様に行った。P2X7R-v1、-v2、-v3 及び-v4 において、各 3' 末端に存在する特異的な塩基配列の違いによりそれらを検出した。その際、使用したプライマーの塩基配列は Table 3 に示す (76)。

**Table 3. Specific primer sets used for real-time PCR amplification of P2X7R and its splice variants.**

Gene	Accession number	Primer sequences		Product size
<i>P2X7 (P2X7R-v1)</i>	NM_011027	Forward	5'- ACACCGTGCTTACAGGTGCTATG -3'	82 bp
		Reverse	5'- GCAACAGCTGGGCAGAATG -3'	
<i>P2X7R-v2</i>	NM_001038845	Forward	5'- TCAAAGGCCAAGAAGTTCCAGTA -3'	94 bp
		Reverse	5'- TAGATCCGACCCCTTCCTTCTG -3'	
<i>P2X7R-v3</i>	NM_01038839	Forward	5'- AAGTCTGCAAGTTGTCAAAGG -3'	99 bp
		Reverse	5'- TAGAGTCAGTCAAAGCATCTC -3'	
<i>P2X7R-v4</i>	NM_01038887	Forward	5'- TTCCAACCTCCAGGAGAGTA -3'	75 bp
		Reverse	5'- AAGCCTTCTTCCTTCTTGGC -3'	

## 10. 免疫細胞染色

免疫細胞染色は第 1 章実験材料及び方法 4 項と同様に行った。一次抗体として rabbit anti-P2X7R C-terminal (1:200, catalogue number: APR-004, Alomone Labs) 及び mouse anti-cadherin (1:200, catalogue number: ab6528)、二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit (1:1000, catalogue number: A11008) 及び Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse (1:1000, catalogue number: A11030) 抗体を使用した。抗体の希釈には Can Get Signal® Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B (TOYOBO) を用いた。

## 11. SDS-PAGE

### 11-1. タンパク質抽出

タンパク質抽出は第 2 章実験材料及び方法 7 項と同様に行った。

### 11-2. 細胞膜及び細胞質画分抽出

細胞画分の抽出には Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit を用い、第 2 章実験材料及び方法 7 項と同様に行った。

### 11-3. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは第 2 章実験材料及び方法 7 項と同様に行った。一次抗体は rabbit anti-P2X7R C-terminal (1:1000, catalogue number: APR-004)、mouse anti-GAPDH (1:1000, catalogue number: 016-25523, Wako)、mouse anti-cadherin (1:1000, catalogue number: ab6528)、mouse anti-HA (1:1000, catalogue number: MMS-101R, Covance) 及び rabbit anti-ATP1B1 (1:2000, catalogue number: GTX109639)、二次抗体は anti-rabbit (1:10000, catalogue number: PI-1000) 及び anti-mouse (1:10000, catalogue number: PI-2000) IgG HRP-linked 抗体を用い、その希釈には PBS または Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を使用した。目的タンパク質の発現量は、検出されたバンド強度を Image J software により定量解析し、GAPDH 及び ATP1B1 のバンド強度にて補正した。

## 12. Blue native-PAGE (BN-PAGE)

### 12-1. タンパク質抽出

培養細胞を PBS で 2 回洗浄した後、trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離し、4°C、1750×g で 5 分間の遠心分離を行った。得られた細胞塊に対し、PBS を 1 mL 添加した後、4°C、20800×g で 5 分間遠心分離した。残渣に cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 含有 BN-PAGE 用 extraction buffer (20 mM Tris, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.5) を適量加え、ダウンス型ホモジナイザー (Wheaton) を用いて氷上で穏やかに細胞を破碎した。界面活性剤として、HEK293T 細胞の場合には digitonin を、アストロサイトの場合には n-dodecyl-β-D-maltoside を細胞懸濁液に添加し、最終濃度 1%にて 4°C で一晩処理した。その後、細胞懸濁液を 4°C、20800×g で 15 分間遠心分離し、上澄を回収した。界面活性剤を含む上澄は BCA 法によりタンパク質濃度を定量し、その濃度を 1 mg/mL に調製した後、同量の

BN-PAGE 用 sample buffer (20% glycerol, 0.4% CBB G-250, 100 mM Bis-Tris, pH 7.0) を加えることで未変性タンパク質を抽出した。

## 12-2. 電気泳動

12-1 にて抽出したタンパク質サンプルを Super Sep™ Ace 5-12% gradient gel (Wako) に添加し、陰極側に cathode buffer (0.02% CBB G-250, 50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris, pH 7.0)、陽極側に anode buffer (50 mM Bis-Tris, pH 7.0) を用いて2時間の泳動 (100 V, 15 mA) を行った。なお、この泳動の最後の5分は 250 V、15 mA で行った。その後、blotting buffer と methanol の混合液 (95:5) で処理した PVDF 膜を用いて、2 時間転写した。転写終了後、PVDF 膜を methanol で2回洗浄し、膜上の CBB G-250 を除去した。以後の操作は、SDS-PAGE の場合と同様に行った。一次抗体には rabbit anti-P2X7R C-terminal (1:1000, catalogue number: APR-004) または rabbit anti-P2X7R extracellular domain (1:1000, catalogue number: APR-008, Alomone Labs) 抗体を用い、ブロッキング処理した PVDF 膜と 4°C で一晩作用させた。二次抗体は anti-rabbit (1:10000, catalogue number: PI-1000) IgG HRP-linked 抗体を室温にて 60 分間作用させた。抗体は Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を用いて調製し、またマーカーとして NativeMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen) を用いて分子サイズを評価し、その発色には 2D-Silver Stain Reagent II (Cosmo Bio) による銀染色を行った。

## 13. 細胞外 ATP 濃度の測定

アストロサイトは 10 分間のプレインキュベーション後、400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む反応溶液中にて 2 時間インキュベートした。その後、細胞外液を ACM として回収し、熱処理 (95°C, 5 分) 後、ATP Bioluminescence Assay kit CLS II (Roche) を用いて ACM 中の ATP 濃度を測定した。蛍光強度の測定は LUMINESCENCE READER BLR-201 (Aloka) を用い、ATP 濃度は検量線に基づいて算出し、その ATP 濃度は CBB 法により定量した各 well 毎のタンパク質濃度で補正した (67)。

## 14. 統計学的処理

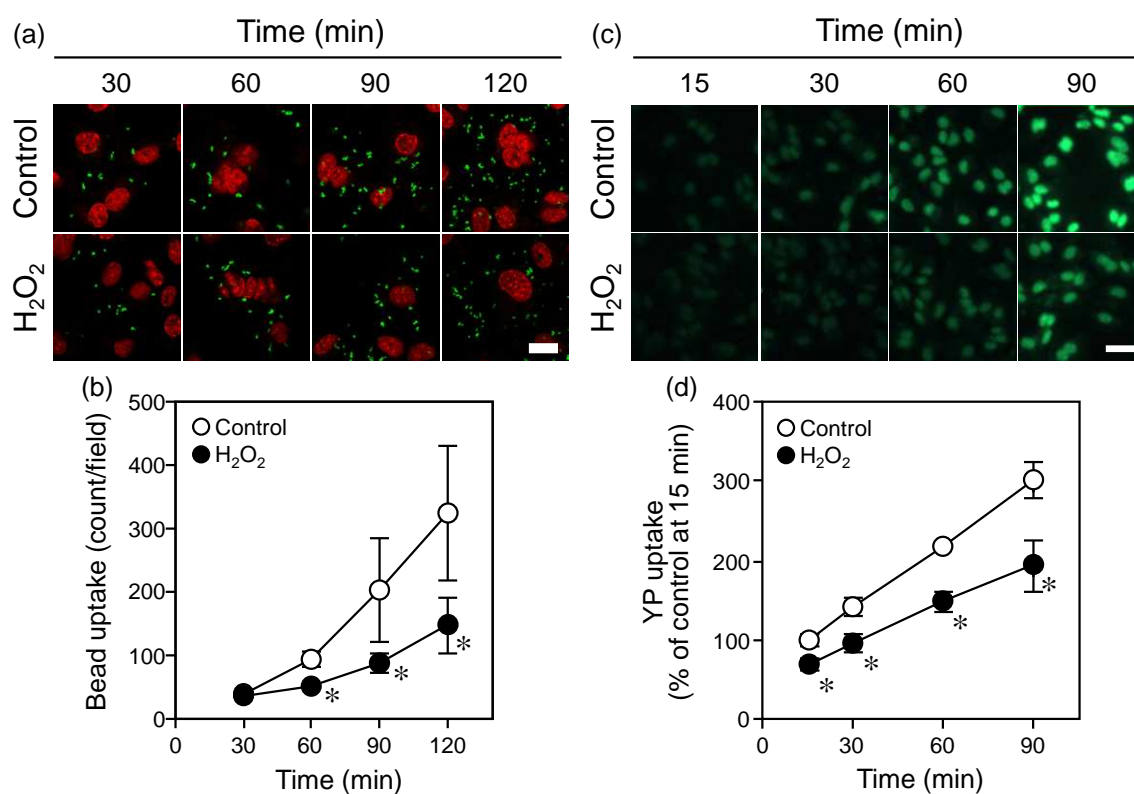
得られた実験値は、平均値 $\pm$ S.D. にて表示した。有意差検定は Ohishi らの報告に基づき (35)、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、2 群間比較には Student's t-test を、多群間比較には 2 元配置分散分析 (Tukey's test) を適用し、得られた  $p$  値が 0.05 未満 (両側) の場合を有意差ありとした。

## 実験成績

### 1. アストロサイトの貪食活性及び P2X7R チャンネル/ポア活性の低下

まず、アストロサイトの貪食活性が酸化ストレス負荷によって変化するか否かを評価するため、bead の細胞内取り込みを検討した。Bead の細胞内取り込みは、control 及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群のいずれにおいても時間依存的に増加したが、後者の取り込みは前者のそれよりも有意に低かった (Fig. 10a, b)。

P2X7R のチャンネル/ポア活性を YP 取り込みにより調べた。両群のアストロサイトによる YP 取り込みは時間依存的に増大し、90 分までほぼ直線的に上昇した (Fig. 10c, d)。Control 群の場合と比較して、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群における YP 取り込みは、評価したいずれの時間においても有意に少なかった。これらのことから、酸化ストレス負荷されたアストロサイトは、その貪食活性及び P2X7R のチャンネル/ポア活性を低下させることが判明した。



**Fig. 10. Decrease of engulfing and P2X7R channel/pore activity in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been treated with  $400 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h, their bead and YP uptake were evaluated. The representative photomicrographs and quantitative results for three or four independent experiments are shown in panels a and b for bead uptake, and c and d for YP uptake, respectively. Relative YP uptake was determined taking the uptake in the control group at 15 min as 100%. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3-4). \* $p < 0.05$  (vs. respective control). Bar =  $20 \mu\text{m}$ . This figure was cited from Fig. 2 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 2. P2X7R の発現局在の変動

酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、P2X7R のチャネル/ポア活性が低下していたことから、次にその発現プロファイルを調べた。カドヘリンの免疫活性が示す細胞膜において認められた P2X7R の免疫活性は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後 4 時間までは変化しなかったが、6 時間以後において減弱する傾向を示し、12 及び 24 時間後では、主に細胞質において検出された (Fig. 11a)。この P2X7R の細胞内局在変化は P2X7R アンタゴニストの一つであり、細胞膜 P2X7R の発現を細胞内部へと移行させると報告のある oxATP (77) 処理による変化と同様であった (Fig. 11b)。

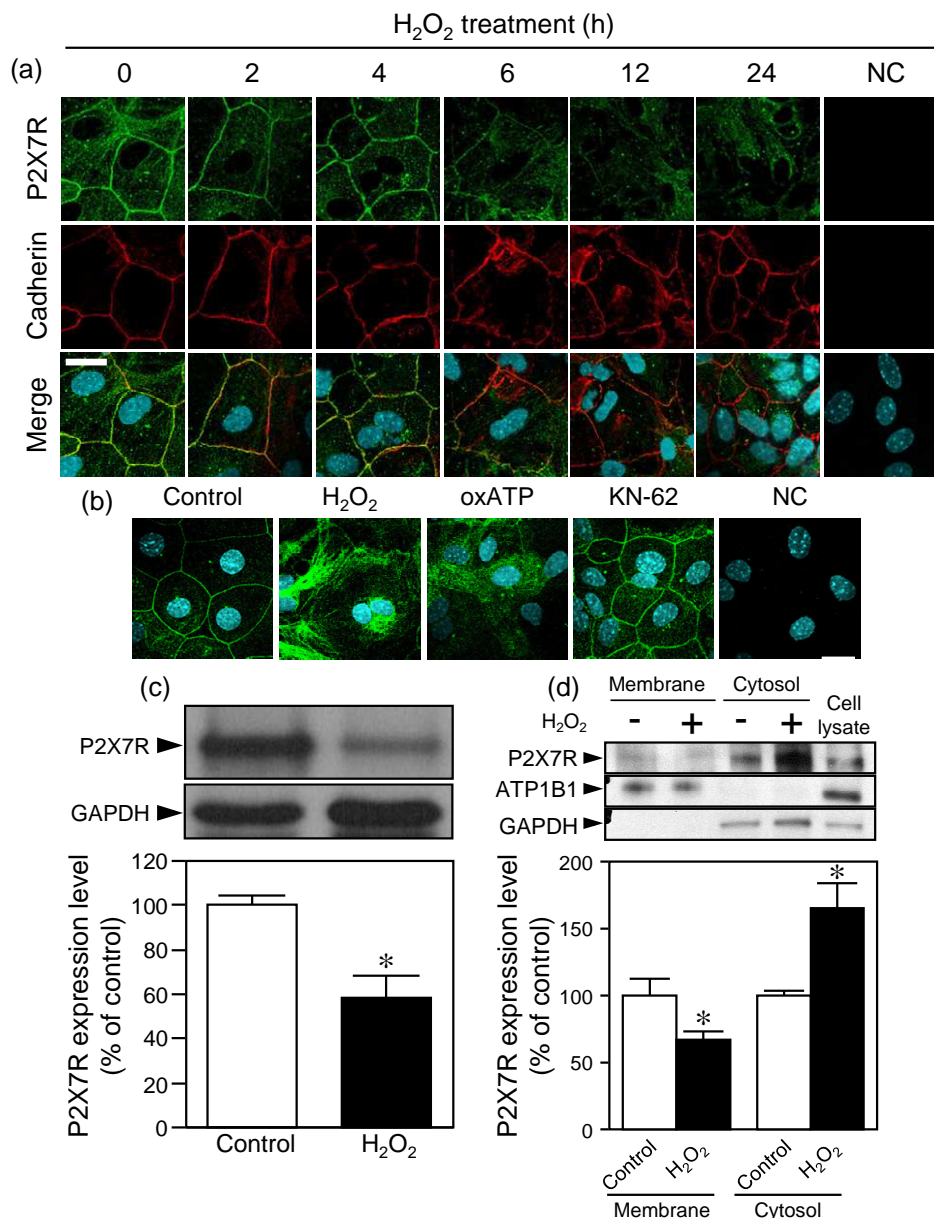
さらに、酸化ストレス負荷がアストロサイトにおける P2X7R のタンパク質発現量に与える影響を評価した。アストロサイトにおける P2X7R の総発現量は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により有意に減少することに加え (Fig. 11c)、その細胞膜及び細胞質画分における発現は、それぞれ減少及び増大することが分かった (Fig. 11d)。

以上のことから、アストロサイトにおける P2X7R の発現は、酸化ストレス負荷により減少すると共に、その細胞内局在は、細胞膜から細胞質へと変化することが明らかとなった。

## 3. P2X7R の機能的発現低下に対する細胞内遊離型亜鉛増大の寄与

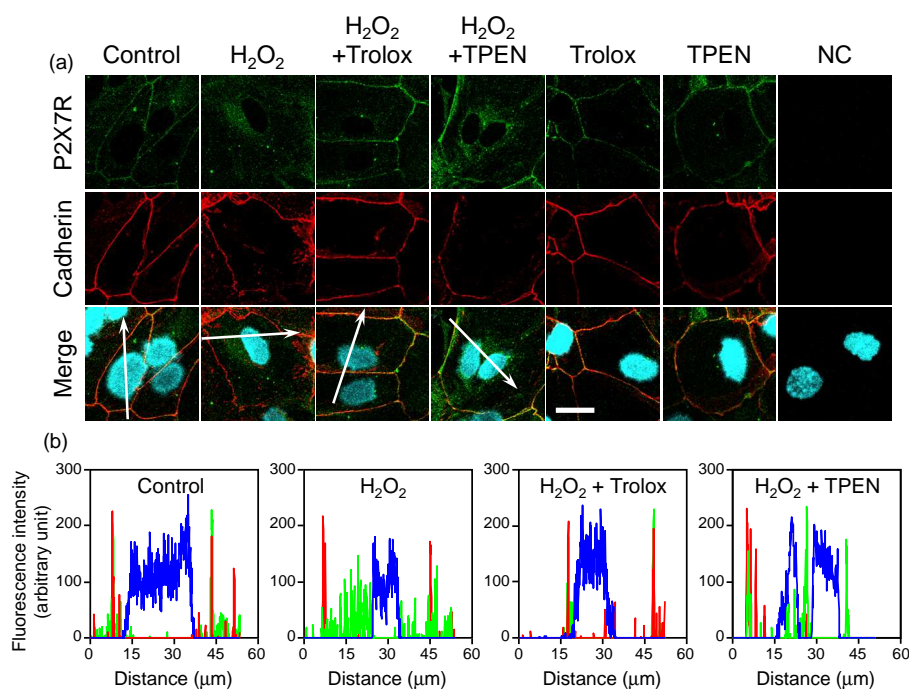
酸化ストレス負荷による細胞内遊離型亜鉛の増大が、P2X7R の機能的発現変動に与える影響を評価した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によって惹起された P2X7R の免疫活性の細胞膜から細胞質への移行は、細胞膜透過型亜鉛キレートである TPEN により、部分的ではあるが抑制され、また抗酸化剤である Trolox 処理ではほぼ完全に抑制された (Fig. 12a)。これらの免疫活性の細胞内局在変化をスペクトラム解析した結果 (Fig. 12b)、control 群において細胞膜を示すカドヘリンの赤のシグナルと共局在した P2X7R の緑のシグナルは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により、Hoechst33258 の青のシグナルが示す核の周辺において認められ、この局在変化は、TPEN 及び Trolox によって、それぞれ一部及びほぼ完全に消失した。これらの結果は、Fig. 11 に示したウェスタンブロットのそれと対応するものであった。

次に、酸化ストレス負荷による細胞内亜鉛の増大がアストロサイトの P2X7R の機能に及ぼす影響を調べた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 2 時間処理により細胞内亜鉛レベルは増大し、このときの bead 及び YP 取り込みは有意に減少した。この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による bead 及び YP 取り込みの減少は、TPEN または Trolox の前処理によって細胞内遊離型亜鉛の増大を抑制したところ、ほぼ完全に消失したことから (Fig. 13a-c)、酸化ストレス負荷によるアストロサイト細胞内における遊離型亜鉛レベルの上昇は、その P2X7R の機能的発現を低下させることが分かった。



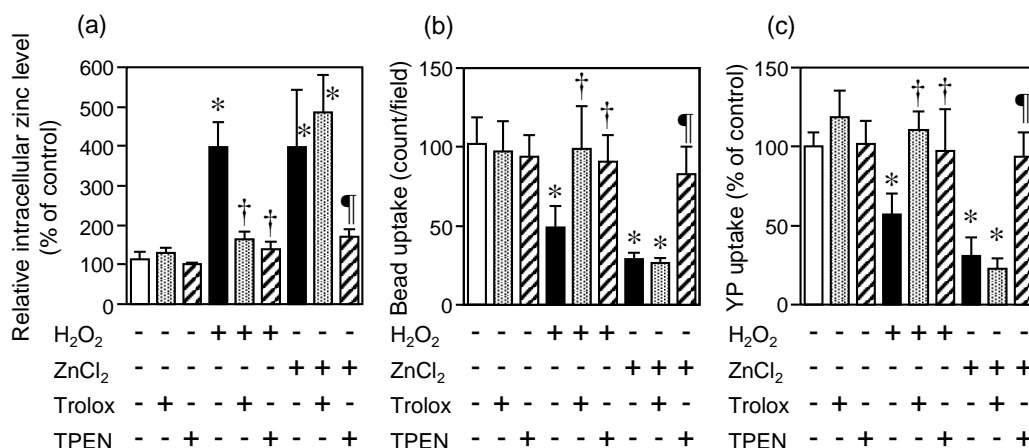
**Fig. 11. Translocation of astrocytic P2X7R from plasma membrane to cytosol by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment.**

Astrocytes were subjected to immunocytochemical analysis, after they had been incubated with 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the indicated times (a) or incubated with 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 300  $\mu$ M oxATP (positive control) or 30  $\mu$ M KN-62 (negative control) for 24 h (b). The immunoreactivities of P2X7R, cadherin and Hoechst 33258 were detected as green, red and blue, respectively. Representative photomicrographs for three independent experiments were shown in panels a and b. Bar = 20  $\mu$ m. After astrocytes had been incubated with 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h, expression levels of P2X7R in the cell lysates (c), and membrane and cytosol fractions (d) were evaluated. In panel d, ATP1B1 and GAPDH are the markers for the membrane and cytosol fractions, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 3–4). \* $p$  < 0.05 (vs. respective control). These figures were cited from Figs. 3 and 4 in *Metalomics* **2017**, 9, 1839-1851.



**Fig. 12. Involvement of increased intracellular labile zinc in translocation of P2X7R in  $H_2O_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with or without 400  $\mu M$   $H_2O_2$  in the presence or absence of 2  $\mu M$  TPEN or 400  $\mu M$  Trolox for 24 h, they were subjected to immunocytochemical analysis. The immunoreactivities of P2X7R, cadherin and Hoechst33258 were detected as green, red and blue, respectively. A negative control (NC) was performed by omitting the 1<sup>st</sup> antibodies to confirm specificity of the immunoreactivity. Representative photomicrographs (a) and representative fluorescence intensity-distance profiles along the arrows in panel a (b) for three independent experiments are shown. Bar = 20  $\mu m$ . This figure was cited from Fig. 5 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.



**Fig. 13. Involvement of increased intracellular labile zinc in regulation of engulfing and P2X7R channel/pore activity in  $H_2O_2$ -treated astrocytes.**

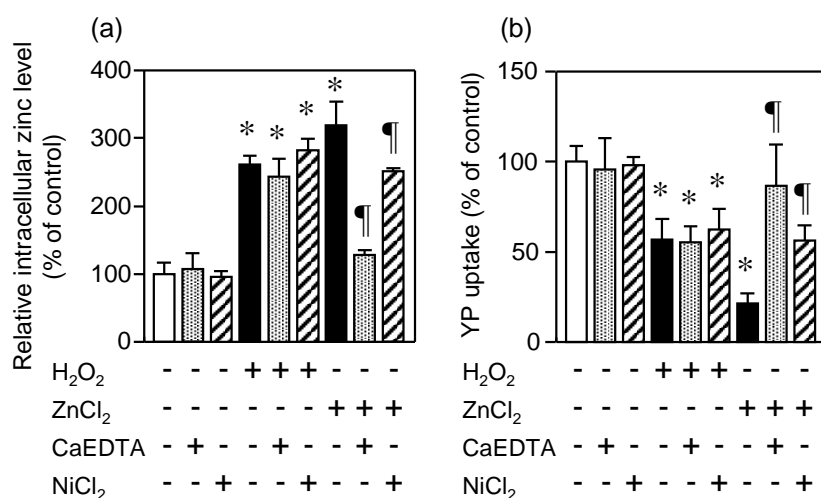
After astrocytes had been incubated with 400  $\mu M$   $H_2O_2$  or 50  $\mu M$   $ZnCl_2$  in the presence or absence of 400  $\mu M$  Trolox or 50  $\mu M$  TPEN for 2 h, their intracellular zinc levels (a), bead uptake (b) and YP uptake (c) were examined. Relative intracellular zinc levels and YP uptake were normalized as to the level in the control (none of the reagents were added). Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 3–8). \* $p$ <0.05 (vs. control (none of the reagents were added)). † $p$ <0.05 (vs.  $H_2O_2$  alone). ¶ $p$ <0.05 (vs.  $ZnCl_2$  alone). This figure was cited from Fig. 6 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

#### 4. P2X7R の機能的発現低下に対する細胞外亜鉛及び ATP の関与

第 1 章において、アストロサイトの酸化ストレスへの暴露は、細胞外への亜鉛の放出を誘導したことから、その P2X7R の機能的発現への影響を調べた (Fig. 14a, b)。まず、細胞外に 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  処理と同程度に細胞内亜鉛レベルを増大させる 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  を添加したところ、YP 取り込みは減少し、これらの変化は、細胞膜非透過型亜鉛キレートである CaEDTA (50  $\mu\text{M}$ ) 及び ZIP1 阻害剤である  $\text{NiCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) により消失した。 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理したアストロサイトにおいても、細胞内遊離型亜鉛レベルの上昇及び YP 取り込みの減少が認められたが、CaEDTA 及び  $\text{NiCl}_2$  によっていずれも影響されなかった。さらに、P2X7R の細胞内発現局在について評価したところ (Fig. 15a)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理によって細胞膜から細胞質画分に発現局在が変動した P2X7R は、細胞膜透過型亜鉛キレートである TPEN の場合とは異なり、細胞膜非透過型亜鉛キレートである CaEDTA によって影響を受けなかった。

低浸透圧ストレス負荷は、アストロサイトからの ATP 放出を惹起することが報告されている (17)。そこでまず、酸化ストレス負荷されたアストロサイトからの ATP 放出の有無を検討した結果、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理群における細胞外 ATP レベルは control 群のそれと比較して有意に高かった (Fig. 15b)。そこで、細胞外 ATP レベルの増大が酸化ストレス負荷による P2X7R の発現局在変化に対する影響を検討した。 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理により細胞質に移行した P2X7R の発現は、P2R アンタゴニストである suramin 及び KN-62 のいずれによっても影響されなかった (Fig. 15a)。

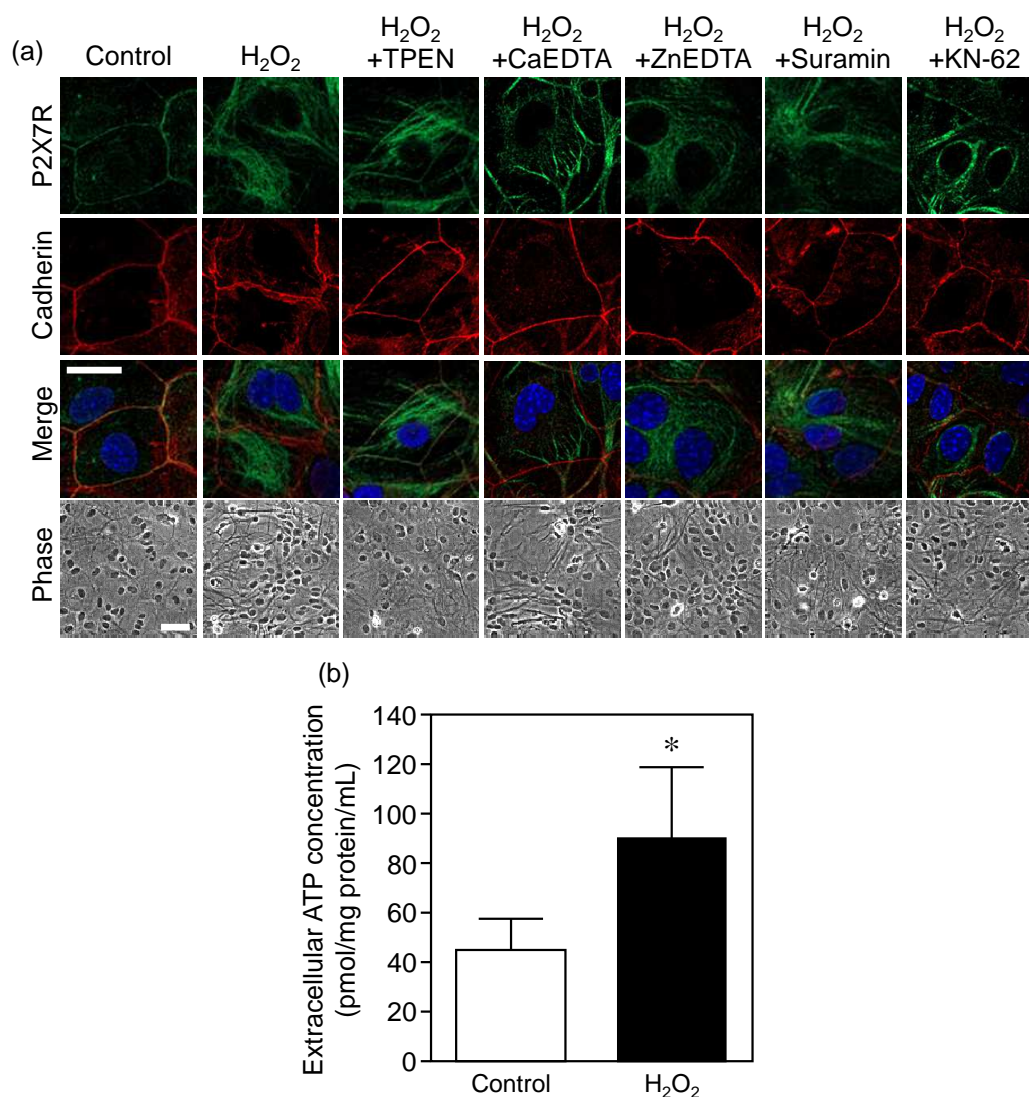
これらのことから、酸化ストレス負荷による細胞外の亜鉛及び ATP の増大は、P2X7R の発現局在の変化に寄与しないことが示された。



**Fig. 14. Involvement of increased extracellular zinc in P2X7R channel/pore activity in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  or 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  in the presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  CaEDTA or 5  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  for 2 h, their intracellular zinc levels (a) and YP uptake (b) were examined. Relative intracellular zinc levels and YP uptake were normalized as to the level in the control (none of the reagents were added). Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 3–8). \* $p$ <0.05 (vs. control (none of the reagents were added)). † $p$ <0.05 (vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone). ‡ $p$ <0.05 (vs.  $\text{ZnCl}_2$  alone).



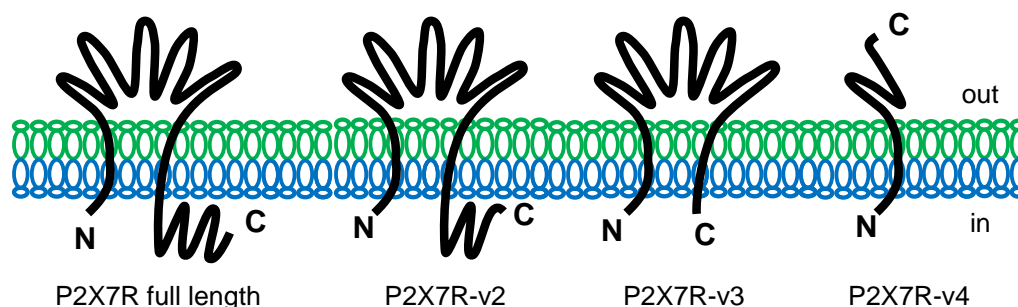


**Fig. 15. Involvement of extracellular zinc and ATP in the translocation of P2X7R in  $H_2O_2$ -treated astrocytes.**

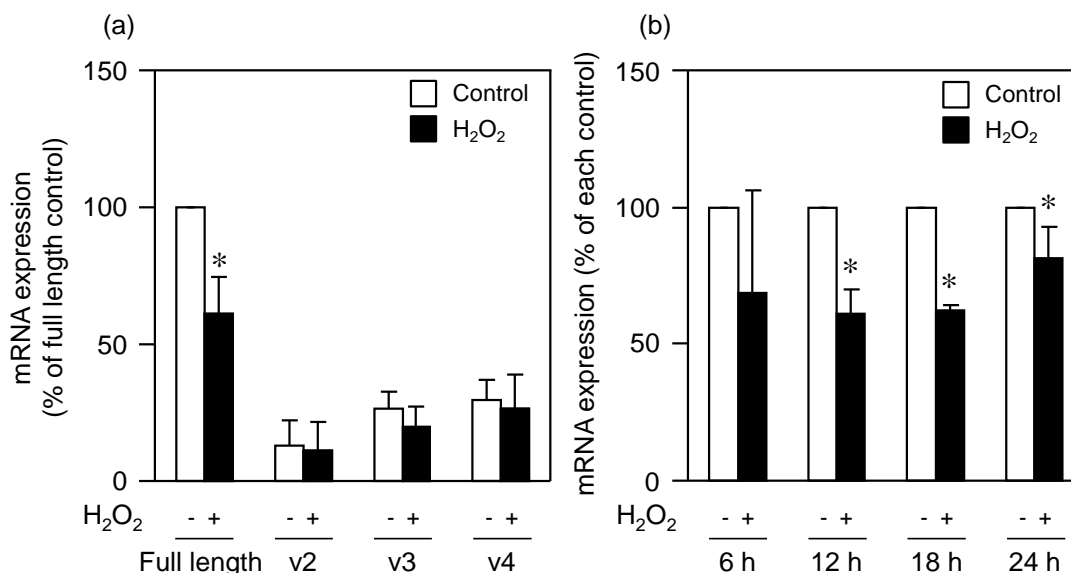
(a) After astrocytes had been incubated with 400  $\mu M$   $H_2O_2$  in the presence and absence of 2  $\mu M$  TPEN, 50  $\mu M$  CaEDTA or ZnEDTA (a negative control for CaEDTA), 50  $\mu M$  suramin, or 10  $\mu M$  KN-62 for 24 h in a  $CO_2$  incubator, they were subjected to immunocytochemical analysis. The immunoreactivities for P2X7R, cadherin and Hoechst33258 were detected as green, red, and blue, respectively. A negative control for immunostaining, which was performed by omitting the 1st antibodies, did not give any signals. Representative photomicrographs for three independent experiments are shown. Bar = 40  $\mu m$ . (b) After astrocytes had been incubated with 400  $\mu M$   $H_2O_2$  for 2 h, extracellular ATP levels in ACM were measured. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=5). \* $p < 0.05$  (vs. control). These figures were cited from Figs. S2 and S3 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 5. P2X7R の発現及び P2X7R 三量体の構成に対する影響

P2X7R は細胞膜において三量体を形成することで機能する。これまでに P2X7R の活性は、P2X7R full length のみで構成されるホモ三量体が最も高いのに対し、それに C 末端を欠損する splice variant が加わったヘテロ三量体では、低下することが明らかになっている (Scheme 1) (76, 78)。そこで、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける P2X7R full length 及びその splice variants の mRNA レベルの発現量を評価した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群における P2X7R full length の発現は、control 群のそれと比べて有意に少なかったものの、その P2X7R-v2、-v3 及び-v4 の発現に変化はなかった (Fig. 16a)。さらに、酸化ストレス負荷による P2X7R full length の発現変化の時間推移を調べたところ、それは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理 6 時間以後において減少することが分かった (Fig. 16b)。このことは、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、P2X7R full length とその splice variants の発現割合が変化すること、すなわち、P2X7R の三量体の構成に変化が生じる可能性を示唆している。



**Scheme 1. Membrane topology of P2X7R and its splice variants.**

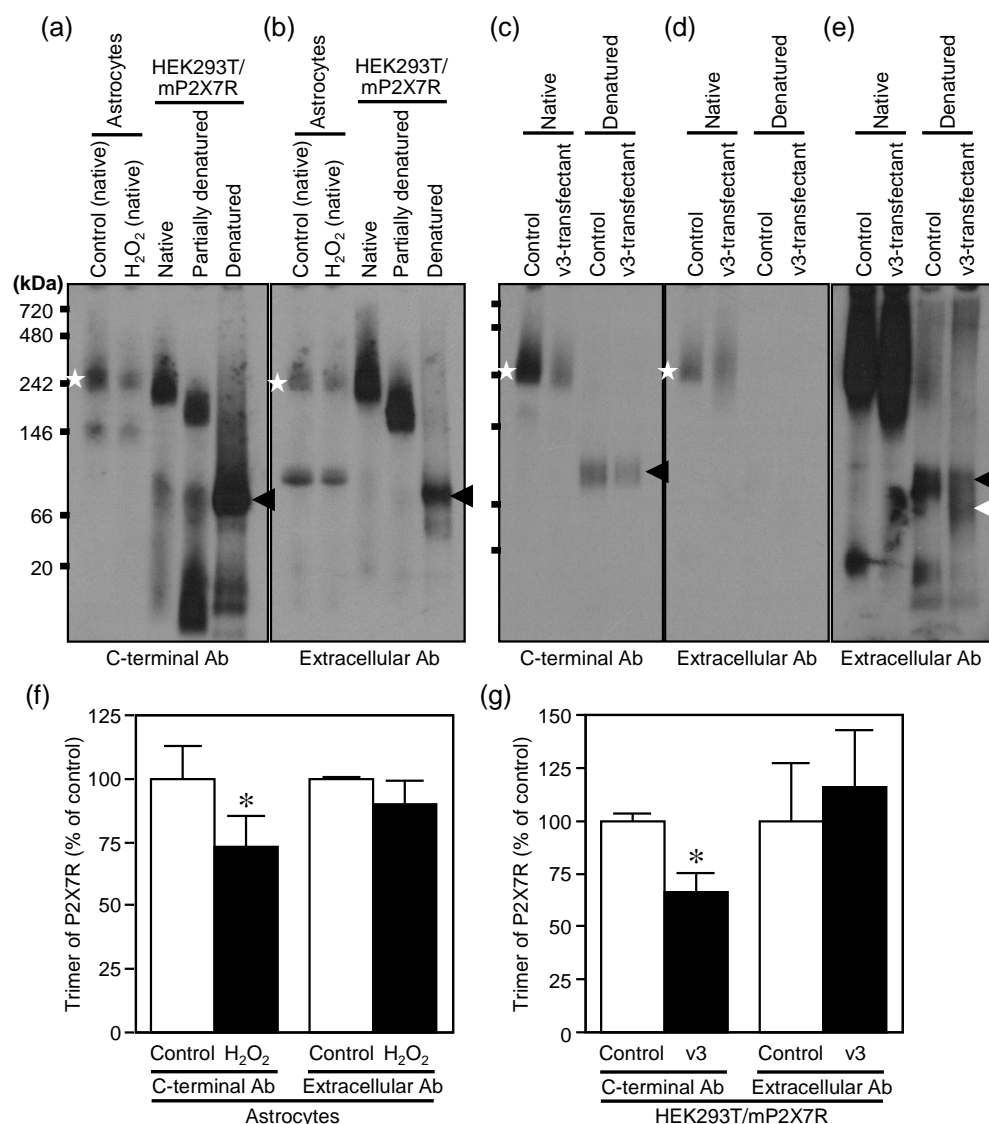


**Fig. 16. Expression profiles of mRNAs for P2X7R and its splice variants in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated astrocytes.**

After astrocytes had been incubated with 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h (a) or the indicated times (b), mRNA expression levels of P2X7R and its splice variants were determined. Relative expression levels were determined taking the expression level of P2X7R full length in the control (a) or in the control at the corresponding time point (b) as 100%. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p$ <0.05 (vs. respective control). This figure was cited from Fig. 7 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

そこで次に、P2X7R 三量体中におけるその full length 発現量の変化の有無を、BN-PAGE により解析した。ここでは、P2X7R の C 末端部位を認識する抗体を用いることで P2X7R full length のみを、また細胞外領域を認識する抗体により P2X7R full length に加え P2X7R-v2 及び -v3 を含む三量体を検出した (Scheme 1)。P2X7R full length の安定発現細胞である HEK293T/mP2X7R 細胞から作製した未変性サンプルでは、P2X7R の三量体に対応する 240 kDa の位置に免疫活性が検出され、また、一部または完全に変性させたサンプルではそれぞれ 150 または 75 kDa の位置に免疫活性が認められ、これらはそれぞれ二量体及び単量体と考えられた。したがって、本 BN-PAGE の実験系が成立していることが確認された。そこで、P2X7R の C 末端を認識する抗体を用いてアストロサイトにおける P2X7R の三量体を検出したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群における 240 kDa 付近の P2X7R 三量体に対応する免疫活性は、control 群と比較して有意に減少していたのに対し (Fig. 17a)、細胞外領域を認識する抗体により検出した場合の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群におけるその免疫活性は control 群とほぼ同等であった (Fig. 17b)。このことから、アストロサイトにおける P2X7R full length によって構成されるホモ三量体の発現量は、酸化ストレス負荷により減少する一方で、その splice variants とのヘテロ三量体の発現は増大することが示された。

さらに、P2X7R splice variants の発現増大が P2X7R 三量体中の full length の発現量に与える影響を精査するため、HEK293T/mP2X7R 細胞に対して P2X7R-v3 を過剰発現させたときの P2X7R full length ホモ三量体の発現量を評価した。P2X7R の C 末端を認識する抗体により検出した P2X7R 三量体に対応する免疫活性は、P2X7R-v3 を過剰発現させることにより有意に減少したものの (Fig. 17c)、細胞外領域を認識する抗体により検出したその免疫活性に変化はなかった (Fig. 17d)。これらの結果は、P2X7R splice variants の発現増大が、その full length の発現を減少させることを示唆している。

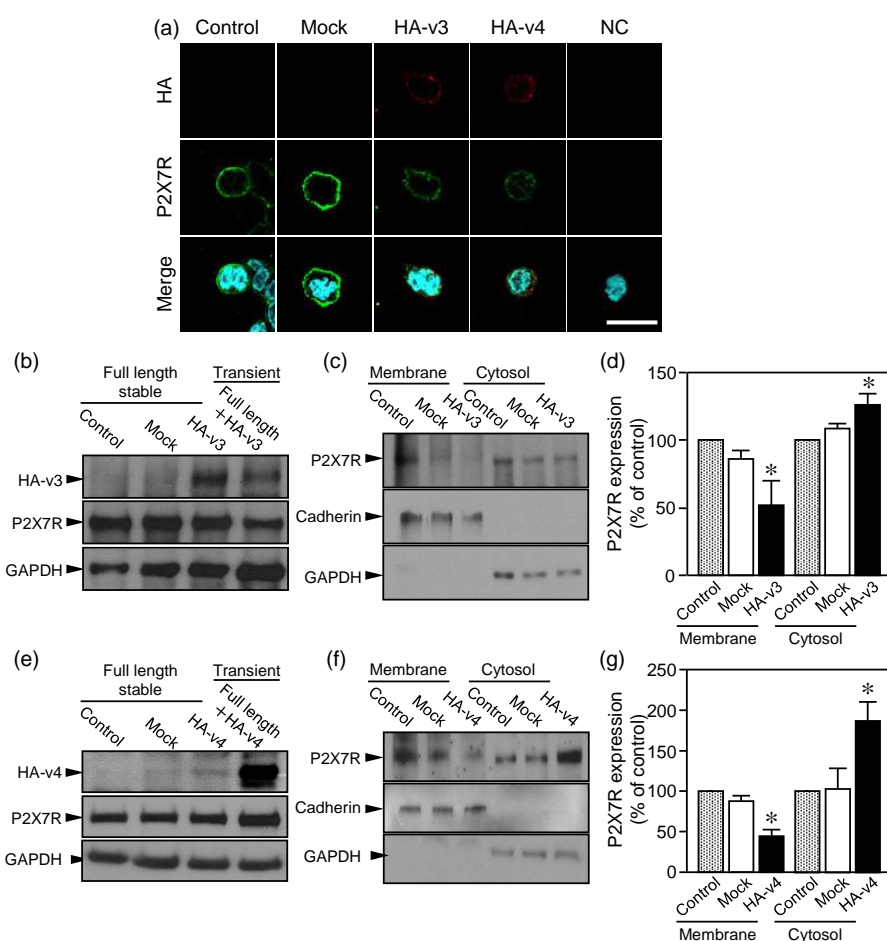


**Fig. 17. Alteration of P2X7R trimer conformation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated astrocytes and P2X7R-v3-expressed HEK293T/mP2X7R cells.**

Astrocytes incubated with 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h and HEK293T/mP2X7R cells introduced with cDNA for P2X7R-v3 were collected. Thereafter, the native samples of astrocytes and HEK293T/mP2X7R cells were analyzed by BN-PAGE. Representative images and the quantitative results are shown in panels a and b for astrocytes, and c, d and e for HEK293T/mP2X7R cells, respectively. The image shown in panel e was obtained at the longer exposure time (10 min) from the same membrane used in panel d, of which the exposure time was 5 sec, to confirm successful expression of P2X7R-v3 in HEK293T/mP2X7R cells. White diamonds, and black and white arrowheads indicate the trimer of P2X7R, and the monomer of full length of P2X7R and P2X7R-v3, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p$ <0.05 (vs. respective control). This figure was cited from Fig. 8 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 6. 細胞膜における P2X7R full length 発現に対するその splice variants の影響

P2X7R splice variants の発現増大がその full length の発現プロファイルに与える影響をより詳細に評価するため、HEK293T/mP2X7R 細胞に対し P2X7R-v3 または-v4 を過剰発現させた際のその full length の発現局在を評価した。HEK293T/mP2X7R 細胞に P2X7R-v3 または-v4 を発現させることにより、細胞膜における P2X7R full length の免疫活性は減少した (Fig. 18a)。さらにウェスタンブロットにより定量的に解析したところ、P2X7R-v3 または-v4 を発現させることによって P2X7R full length の総発現量に変化はなかったものの (Fig. 18b, e)、細胞膜におけるその発現は有意に減少し、細胞質におけるそれは有意に増加していた (Fig. 18c, d, f, g)。したがって、P2X7R splice variants の発現増大が細胞膜におけるその full length の発現を減少させることが明らかとなった。



**Fig. 18. Translocation of P2X7R from plasma membrane to cytosol by expression of P2X7R-v3 or -v4.**

After HEK293T/mP2X7R cells had been introduced with cDNA for HA-v3 or -v4, their expression levels of P2X7R were determined by immunocytochemistry (a) and western blotting (b, c, e, f). As a positive control for expression of P2X7R-v3 and -v4, HEK293T cells introduced with cDNAs for P2X7R and HA-v3 or -v4, respectively (transient). In panels b and e, and c and f, western blotting was performed using cell lysates, and membrane and cytosol fractions, respectively. In panels c and f, cadherin and GAPDH are loading controls for the membrane and cytosol fractions, respectively. Representative photomicrographs (a) and western blots (b, c, e, f) for three independent experiments are shown, the quantitative results for panels c and f being given in panels d and g, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p$ <0.05 (vs. respective mock). Bar = 20  $\mu$ m. This figure was cited from Fig. S4 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 考 察

本章では、細胞傷害を生じないレベルの酸化ストレスを負荷されたアストロサイトではその貪食活性が低下しており、これは少なくとも一部、細胞内遊離型亜鉛の増大により惹起された細胞膜における P2X7R の機能的発現の減少に起因することを明らかにした。

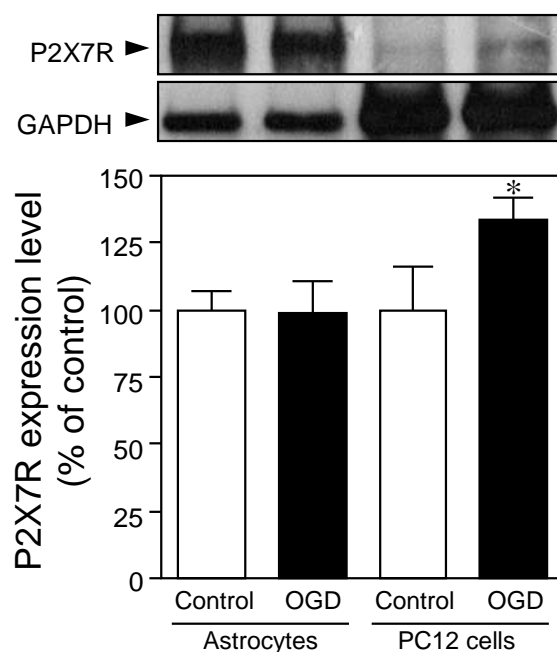
脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、異物の貪食・消化を行うことで中枢神経系における生体防御の中心的役割を担っており、病態時における細胞外亜鉛の増大によってその貪食活性が増大する (3)。一方、アストロサイトもアミロイド  $\beta$  や死細胞片を貪食し (46, 79, 80)、神経細胞保護的に働くなど中枢神経系の環境を正常に保つ免疫システムとしての役割を担う (81)。これまで、アストロサイトの貪食活性の制御機構は不明であったが、今回、酸化ストレス負荷による細胞内遊離型亜鉛の増大がその活性を低下させることが分かった。これらのことから、生理的状态において貪食能を示すアストロサイトは、酸化ストレス負荷によりその貪食活性を低下させる一方で、ミクログリアが貪食能を発現するスイッチングが生じており、これを制御する因子が亜鉛であることが示された。

また、細胞内遊離型亜鉛によるアストロサイトの貪食活性の制御は、P2X7R の機能的発現変動を介したものであった。この P2X7R の機能的発現の低下は、その full length と splice variants の発現割合の変化に伴った P2X7R full length ホモ三量体の減少に起因することが分かった。この発現プロファイルの変化は、亜鉛が P2X7R の遺伝子発現におけるスプライシングに影響を及ぼした可能性が考えられるが、その詳細は不明である。また、P2X7R full length の細胞膜から細胞質への局在変化は、P2X7R full length の細胞膜への輸送が splice variants により障害された可能性や、splice variants によって full length が細胞質に誘導された可能性などが推察される。このことについて、明確に結論付けることはできないものの、P2X7R 安定発現細胞を用いた実験では、その splice variants の発現により full length の発現が核周辺に移行していたことから、後者の可能性が高いと著者は考える。

P2X7R の SNP は、そのチャネル/ポア活性を低下させることが報告されており (71, 82)、また、気分障害といった精神疾患の発症に寄与することも明らかになっている (72, 83, 84)。さらに、マウスを用いた検討においても、アストロサイトにおける P2X7R splice variants の発現プロファイルの差異が、気分障害の発症に寄与することが示唆されている (76)。これらのことから、酸化ストレス負荷による P2X7R splice variants の機能的発現の変化は、うつ病などの精神神経疾患に関与する可能性が推察される。

近年、Hirayama らは中大脳動脈閉塞を施したマウスのアストロサイトでは P2X7R の発現が増加することを報告している (55)。これに対して著者は、酸化ストレス負荷によりアストロサイトにおける P2X7R の発現は減少するという相反する結果を得た。この矛盾した結果についての説明根拠を得るために、脳虚血後の酸化ストレス負荷を反映する *in vitro* 実験系として汎用される oxygen glucose deprivation (OGD) (85) を適用し、アストロサイトにおける P2X7R の発現を評価した。その結果、ポジティブコントロールとして用いた PC12 細胞では P2X7R の発現が増大したのに対し、OGD 処理されたアストロサイトではその発現に変化はなかった

(Fig. 19)。このことは、病態を想定した *in vitro* 実験系における酸化ストレス負荷条件下では、アストロサイトの P2X7R の機能的発現減少が検出できないレベルであることを示している。したがって、著者の結果と Hirayama らの結果との相違は、Hirayama らが green fluorescent protein (GFP) 付加した P2X7R を発現するマウスを用いて得た結果であることに加え、直接的及び間接的なストレス負荷の違いや他の細胞種との相互作用など、実験条件の差異に起因すると考えられる。



**Fig. 19. Expression profiles of P2X7R in OGD-treated astrocytes.**

After cells had been incubated under hypoxic conditions at 37°C for 2 h in a multi-gas incubator, they were cultured in 5.6 mM glucose-containing EBSS with oxygen for 24 h. Thereafter, the expression levels of P2X7R in cell lysates were determined. Representative images and the quantitative results for three independent experiments are shown. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (N=3). \* $p$ <0.05 (vs. respective control). This figure was cited from Fig. S5 in *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851.

## 総 括

本研究では、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける亜鉛動態変動が、その細胞機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行い、以下の成績を得た。

第 1 章において、 $400\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$  処理による酸化ストレスの負荷は、アストロサイトの細胞生存率を低下させることなく細胞の活性化を惹起すると共に、細胞外及び細胞内亜鉛レベルを増大させることが判明した。

第 2 章では、酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、細胞外亜鉛の取り込み活性が増大し、これは少なくとも一部、細胞膜における ZIP1 の発現増大に起因することが示された。

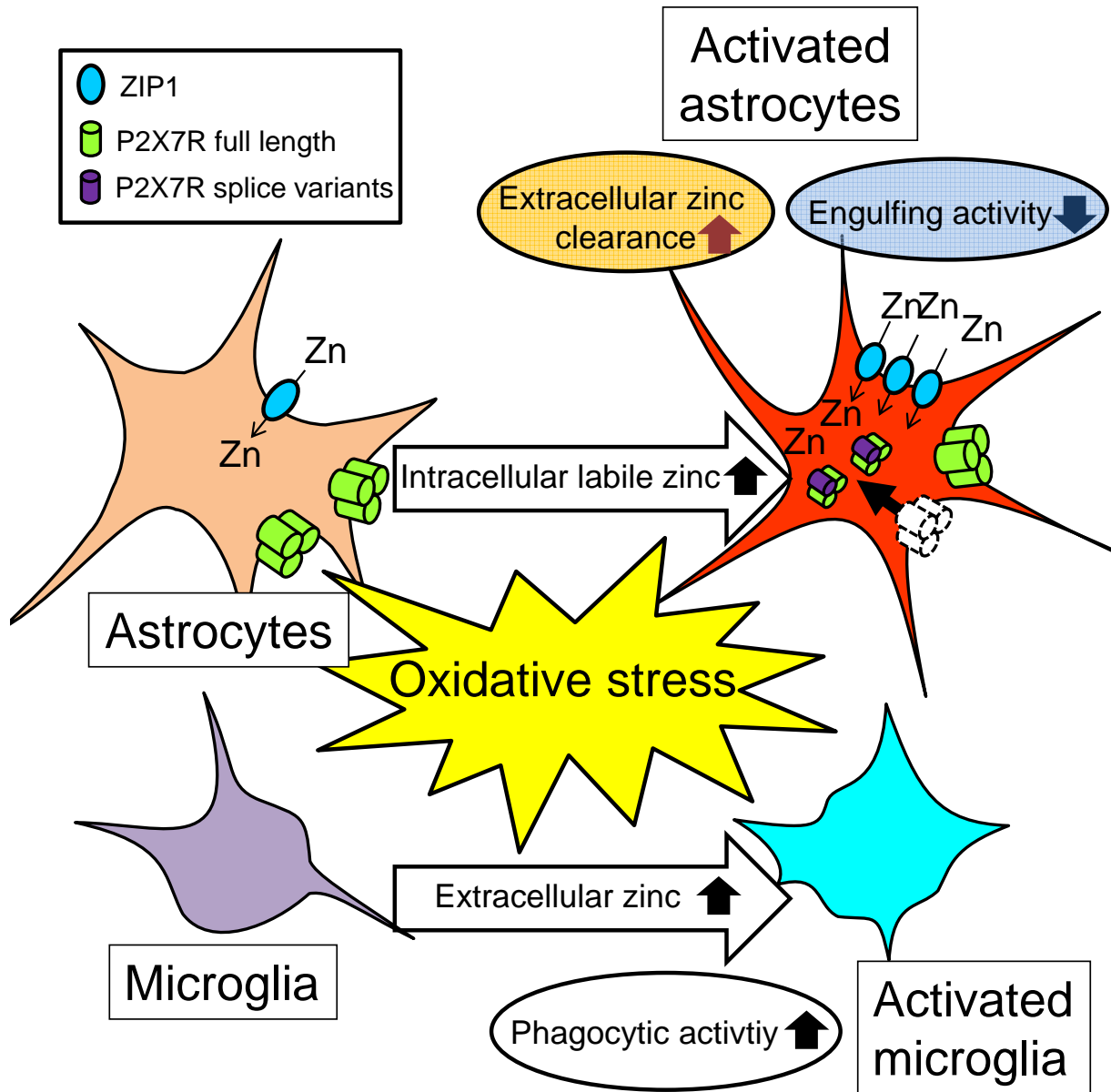
第 3 章において、酸化ストレス負荷アストロサイトは、細胞内亜鉛の増大を介して細胞膜における P2X7R の機能的発現を低下させ、それにより自身の貪食活性を低下させることが明らかとなった。

以上の成績に基づき、著者は、酸化ストレスの発生を伴った病態時のアストロサイトにおいて動態が変化する亜鉛は、アストロサイトの細胞外亜鉛クリアランスを亢進させると共に、自身の貪食活性を低下させる一方で、ミクログリアを活性化することによりその貪食能を誘導させるという 2 種類のグリア細胞の機能変化、すなわち modal shift を制御する重要な分子であることを提唱する (Scheme 2)。

さらに、酸化ストレス負荷されたアストロサイトの亜鉛クリアランスの亢進は、細胞外亜鉛レベルを低下させるが、これが繰り返し生じた場合、シナプス前神経細胞による亜鉛取り込みの減少、すなわちシナプス前小胞における亜鉛の欠乏を引き起こす可能性が示唆される。また、アストロサイトの P2X7R の機能的発現減少を介したその貪食活性の低下が、繰り返しの酸化ストレス負荷により不可逆的になることも推察でき、このようなアストロサイトの細胞機能が持続的に変化することが、うつ病の発症に繋がる可能性も十分に考えられる。そのため今後、アストロサイトに対する繰り返しの酸化ストレス負荷が亜鉛クリアランス並びに P2X7R の機能的発現に与える影響を精査することは、うつ病の発症機構を解明する上で重要であり、これについては当研究室にて現在検討が進められている。

近年、うつ病の治療に用いられている paroxetine などの抗うつ薬はモノアミン類の再取り込み以外にも、アストロサイトに発現する ATP 受容体への作用もその抗うつ効果の発現に関与すること (86, 87)、ATP や亜鉛の補充がそのうつ様行動を改善することも報告されている (73, 88)。したがって、本研究で得られた成績は、酸化ストレス負荷がその発症要因の一つとされているうつ病などの精神神経疾患に対する新たな治療法を開発する上で、亜鉛に着目したグリア細胞機能制御がその標的となりうることを示す有益な基礎的情報であると考えられる。





**Scheme 2. Schematic diagram for zinc-induced modal shift of astrocytes and microglia.**

Under oxidative stress-loaded astrocytes, both extracellular and intracellular zinc levels are increased. By the former, microglia M1 activation is induced, while to prevent extensive microglial activation, astrocytic zinc clearance mediated by ZIP1 is up-regulated. By the latter, astrocytic functional expression of P2X7R is down-regulated, and the engulfing activity is decreased. Therefore, it is suggested that astrocytic zinc might be a key molecule for the induction of the modal shift of astrocytes and microglia under pathological conditions with oxidative stress.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました恩師 京都薬科大学 衛生化学分野 長澤 一樹 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、直接の御指導と種々の有益なご助言を賜りました京都薬科大学 衛生化学分野 大石 晃弘 助教に、深くお礼申し上げます。

本論文の作製にあたり、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 代謝分析学分野 安井 裕之 教授ならびに細胞生物学分野 藤室 雅弘 教授に、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、御指導と種々の有益なご助言を賜りました摂南大学薬学部 西田 健太郎 特任講師に深謝し、心より御礼申し上げます。

Blue native PAGE の実験手法の確立に際し、有益な御助言を賜りました中京学院大学看護学部 眞部 孝幸 教授に厚く御礼申し上げます。

また、実験の一部に御協力いただきました 麻野 浩史 学士、須藤 嵩史 学士、向井 あゆみ 学士、弘田 恵美 学士、回渕 俊生 学士、大嶋 千晶 学士、竹林 直人 学士、松村 真裕 学士をはじめとする衛生化学分野研究室員、卒業生の諸氏に深く御礼申し上げます。

研究生生活を送るにあたり、叱咤激励し、時には助言をいただきました沢井製薬株式会社 製剤研究部 瀬川 将平 博士に深く御礼申し上げます。

また末筆ながら、大学院生活を送るにあたり、互いに切磋琢磨し合いました他分野大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念いたします。

## 引用文献

- 1) H. K. Kimelberg, S. K. Goderie, S. Higman, S. Pang, R. A. Wanievski. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* **1990**, 10, 1583-1591.
- 2) Karl Nägler, Daniela H. Mauch, Frank W. Pfrieger. Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J. Physiol.* **2001**, 533, 665-679.
- 3) Marina A. Lynch. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol. Neurobiol.* **2009**, 40, 139-156.
- 4) Marie-Ève Tremblay, Rebecca L. Lowery, Ania K. Majewska. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* **2010**, 8, e1000527.
- 5) Liliana Pedraza, Jeffrey K. Huang, David R. Colman. Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron* **2001**, 30, 335-344.
- 6) 厚生労働省, 第6次医療計画, **2013**.
- 7) P. W. Gold, G. P. Chrousos. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol. Psychiatry* **2002**, 7, 254-275.
- 8) Nathan A. DeCarolis, Amelia J. Eisch. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation. *Neuropharmacology* **2010**, 58, 884-893.
- 9) Grazyna Rajkowska, Craig A. Stockmeier. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr. Drug Targets* **2013**, 14, 1225-1236.
- 10) M. J. Webster, M. B. Knable, N. Johnston-Wilson, K. Nagata, M. Inagaki, R. H. Yolken. Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav. Immun.* **2001**, 15, 388-400.
- 11) Mounira Banasr, Ronald S. Duman. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol. Psychiatry* **2008**, 64, 863-870.
- 12) Inga Wessels, Martina Maywald, Lothar Rink. Zinc as a gatekeeper of immune function. *Nutrients* **2017**, 9, E1286.
- 13) Atsushi Takeda, Masatoshi Nakamura, Hiroaki Fujii, Haruna Tamano. Synaptic Zn(2+) homeostasis and its significance. *Metallomics* **2013**, 5, 417-423.
- 14) Kyung-Min Noh, Jae-Young Koh. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* **2000**, 20, RC111.
- 15) Yang-Hee Kim, Jae-Young Koh. The role of NADPH oxidase and neuronal nitric oxide synthase in zinc-induced poly(ADP-ribose) polymerase activation and cell death in cortical culture. *Exp. Neurol.* **2002**, 177, 407-418.
- 16) Nadine M. Tassabehji, Rikki S. Corniola, Almamoun Alshingiti, Cathy W. Levenson. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol. Behav.* **2008**, 95, 365-369.
- 17) Shohei Segawa, Takeshi Nishiura, Takahiro Furuta, Yuki Ohsato, Misaki Tani, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Zinc is released by cultured astrocytes as a gliotransmitter under hypoosmotic

- stress-loaded conditions and regulates microglial activity. *Life Sci.* **2014**, 94, 137-144.
- 18) Sook-Jeong Lee, Bo-Ra Seo, Eui-Ju Choi, Jae-Young Koh. The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes. *Glia* **2014**, 62, 639-648.
  - 19) Youji Kitamura, Yasuhiko Iida, Jun Abe, Masaki Mifune, Fumiyo Kasuya, Masayuki Ohta, Kazuo Igarashi, Yutaka Saito, Hideo Saji. Release of vesicular  $Zn^{2+}$  in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res. Bull.* **2006**, 69, 622-625.
  - 20) Patricia Aguilar-Alonso, Daniel Martinez-Fong, Nidia G. Pazos-Salazar, Eduardo Brambila, Juan A. Gonzalez-Barrios, Alejandro Mejorada, Gonzalo Flores, Lourdes Millan-PerezPeña, Hector Rubio, Bertha A. Leon-Chavez. The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Res.* **2008**, 1200, 89-98.
  - 21) Caroline Kruczek, Boris Görg, Verena Keitel, Elvis Pirev, Klaus D. Kröncke, Freimut Schliess, Dieter Häussinger. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia* **2009**, 57, 79-92.
  - 22) Richard J. Katz. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1982**, 16, 965-968.
  - 23) Boldizsár Czéh, Mária Simon, Barthel Schmeling, Christoph Hiemke, Eberhard Fuchs. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* **2006**, 31, 1616-1626.
  - 24) Janne Grønli, Clive Bramham, Robert Murison, Tambudzai Kanhema, Eldbjørg Fiske, Bjørn Bjorvatn, Reidun Ursin, Chiara M. Portas. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, 85, 842-849.
  - 25) Sam A. Golden, Herbert E. Covington III, Olivier Berton, Scott J. Russo. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 1183-1191.
  - 26) İbrahim Eren, Mustafa Nazıroğlu, Arif Demirdaş. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Res.* **2007**, 32, 1188-1195.
  - 27) Ji-Seon Seo, Jin-Young Park, Juli Choi, Tae-Kyung Kim, Joo-Hyun Shin, Ja-Kyeong Lee, Pyung-Lim Han. NADPH Oxidase Mediates Depressive Behavior Induced by Chronic Stress in Mice. *J. Neurosci.* **2012**, 32, 9690-9699.
  - 28) Shohei Segawa, Nao Tatsumi, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Characterization of zinc uptake by mouse primary cultured astrocytes and microglia. *Metallomics* **2015**, 7, 1067-1077.
  - 29) Sayaka Ueno, Masako Tsukamoto, Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Maki K. Yamada, Nobuyoshi Nishiyama, Tetsuo Nagano, Norio Matsuki, Yuji Ikegaya. Mossy fiber  $Zn^{2+}$  spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J. Cell Biol.* **2002**, 158, 215-220.
  - 30) Atsushi Takeda, Shunsuke Takada, Masatoshi Nakamura, Miki Suzuki, Haruna Tamano, Masaki

- Ando, Naoto Oku. Transient increase in  $Zn^{2+}$  in hippocampal CA1 pyramidal neurons causes reversible memory deficit. *PLoS One* **2011**, 6, e28615.
- 31) Hajo Haase, Silke Hebel, Gabriela Engelhardt, Lothar Rink. Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. *Anal. Biochem.* **2006**, 352, 222-230.
  - 32) Keigo Nishida, Aiko Hasegawa, Susumu Nakae, Keisuke Oboki, Hirohisa Saito, Satoru Yamasaki, Toshio Hirano. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J. Exp. Med.* **2009**, 206, 1351-1364.
  - 33) Tiina M. Kauppinen, Youichirou Higashi, Sang Won Suh, Carole Escartin, Kazuki Nagasawa, Raymond A. Swanson. Zinc triggers microglial activation. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 5827-5835.
  - 34) Youichirou Higashi, Shohei Segawa, Takaaki Matsuo, Shogo Nakamura, Yukiko Kikkawa, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. *Glia* **2011**, 59, 1933-1945.
  - 35) Akihiro Ohishi, Yuka Keno, Ayaka Marumiya, Yugo Sudo, Yukako Uda, Kinuyo Matsuda, Yuki Morita, Takahiro Furuta, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Expression level of P2X7 receptor is a determinant of ATP-induced death of mouse cultured neurons. *Neuroscience* **2016**, 319, 35-45.
  - 36) Ira Kukic, Shannon L. Kelleher, Kirill Kiselyov.  $Zn^{2+}$  efflux through lysosomal exocytosis prevents  $Zn^{2+}$ -induced toxicity. *J. Cell Sci.* **2014**, 127, 3094-3103.
  - 37) Youichirou Higashi, Takaaki Aratake, Shogo Shimizu, Takahiro Shimizu, Kumiko Nakamura, Masayuki Tsuda, Toshio Yawata, Tetuya Ueba, Motoaki Saito. Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 43778.
  - 38) Adrian K. West, Juan Hidalgo, Donnie Eddins, Edward D. Levin, Michael Aschner. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* **2008**, 29, 489-503.
  - 39) Sook-Jeong Lee, Kyung Sook Cho, Jae-Young Koh. Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* **2009**, 57, 1351-1361.
  - 40) Sook-Jeong Lee, Mi-Ha Park, Hyun-Jae Kim, Jae-Young Koh. Metallothionein-3 regulates lysosomal function in cultured astrocytes under both normal and oxidative conditions. *Glia* **2010**, 58, 1186-1196.
  - 41) Wolfgang Maret. Oxidative metal release from metallothionein *via* zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 237-241.
  - 42) Jade Durand, Gabriele Meloni, Christine Talmard, Milan Vašák, Peter Faller. Zinc release of Zn7-metallothionein-3 induces fibrillar type amyloid- $\beta$  aggregates. *Metallomics* **2010**, 2, 741-744.
  - 43) Michelle Aarts, Koji Iihara, Wen-Li Wei, Zhi-Gang Xiong, Mark Arundine, Waldy Cerwinski, John F. MacDonald, Michael Tymianski. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* **2003**, 115, 863-877.
  - 44) Sunday A. Abiria, Grigory Krapivinsky, Rajan Sah, Ana G. Santa-Cruz, Dipayan Chaudhuri, Jin Zhang, Pichet Adstamongkonkul, Paul G. DeCaen, David E. Clapham. TRPM7 senses oxidative stress to release  $Zn^{2+}$  from unique intracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, 114,

E6079-E6088.

- 45) Zhao Zeng, Tiandong Leng, Xuechao Feng, Huawei Sun, Koichi Inoue, Li Zhu, Zhi-Gang Xiong. Silencing TRPM7 in mouse cortical astrocytes impairs cell proliferation and migration *via* ERK and JNK signaling pathways. *PLoS One* **2015**, 10, e0119912.
- 46) R. J. McKeon, R. C. Schreiber, J. S. Rudge, J. Silver. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* **1991**, 11, 3398-3411.
- 47) Jill R. Faulkner, Julia E. Herrmann, Michael J. Woo, Keith E. Tansey, Ngan B. Doan, Michael V. Sofroniew. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 2143-2155.
- 48) Raymond A. Swanson, Jialing Liu, Johann W. Miller, Jeffrey D. Rothstein, Kevin Farrell, Becky A. Stein, Maria C. Longuemare. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci.* **1997**, 17, 932-940.
- 49) Shumin Duan, Christopher M. Anderson, Becky A. Stein, Raymond A. Swanson. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.* **1999**, 19, 10193-10200.
- 50) Niels C. Danbolt. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **2001**, 65, 1-105.
- 51) Toshiyuki Fukada, Taiho Kambe. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* **2011**, 3, 662-674.
- 52) Shohei Segawa, Makiko Shibamoto, Mikayo Ogawa, Saori Miyake, Kaho Mizumoto, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. The effect of divalent metal cations on zinc uptake by mouse Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1). *Life Sci.* **2014**, 113, 40-44.
- 53) Kiyoshi Yamaoka, Yusuke Tanigawara, Terumichi Nakagawa, Toyozo Uno. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1981**, 4, 879-885.
- 54) Takaaki Kirino, Ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2002**, 22, 1283-1296.
- 55) Yuri Hirayama, Yuri Ikeda-Matsuo, Shoji Notomi, Hiroshi Enaida, Hiroyuki Kinouchi and Schuichi Koizumi. Astrocyte-mediated ischemic tolerance. *J. Neurosci.* **2015**, 35, 3794-3805.
- 56) Jin-Yeon Lee, Yu-Jin Kim, Tae-Youn Kim, Jae-Young Koh and Yang-Hee Kim. Essential role for zinc-triggered p75NTR activation in preconditioning neuroprotection. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 10919-10927.
- 57) Fudi Wang, Jodi Dufner-Beattie, Byung-Eun Kim, Michael J. Petris, Glen Andrews, David J. Eide. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 24631-24639.
- 58) Liping Huang, Catherine P. Kirschke. A di-leucine sorting signal in ZIP1 (SLC39A1) mediates endocytosis of the protein. *FEBS J.* **2007**, 274, 3986-3997.
- 59) R. Alan North, Annmarie Surprenant. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, 40, 563-580.
- 60) Vera Ralevic, Geoffrey Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, 50, 413-492.

- 61) Heike Franke, Peter Illes. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol. Ther.* **2006** , 109, 297-324.
- 62) R. Alan North. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 1013-1067.
- 63) Christopher M. Anderson, Maiken Nedergaard. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.* **2006**, 29, 257-262.
- 64) Sylvia O. Suadicani, Celia F. Brosnan, Eliana Scemes. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Neurosci.* **2006**, 26, 1378-1385.
- 65) Stephen D. Skaper, Patrizia Debetto, Pietro Giusti. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* **2010**, 24, 337-345.
- 66) Kentaro Nishida, Tsunetoshi Nakatani, Akihiro Ohishi, Hiroto Okuda, Youichirou Higashi, Takaaki Matsuo, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa. Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death. *J. Neurochem.* **2012**, 122, 1118-1128.
- 67) Kazuki Nagasawa, Carole Escartin, Raymond A. Swanson. Astrocyte cultures exhibit P2X7 receptor channel opening in the absence of exogenous ligands. *Glia* **2009**, 57, 622–633.
- 68) Mina Yamamoto, Yosuke Kamatsuka, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 439, 90-95.
- 69) Yosuke Kamatsuka, Manami Fukagawa, Takahiro Furuta, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Astrocytes, but not neurons, exhibit constitutive activation of P2X7 receptors in mouse acute cortical slices under non-stimulated resting conditions. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, 37, 1958-1962.
- 70) James G. McLarnon, Jae K. Ryu, Douglas G. Walker, Hyun B. Choi, Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, 65, 1090-1097.
- 71) Ben J. Gu, Ronald Sluyter, Kristen K. Skarratt, Anne N. Shemon, Lan-Phuong Dao-Ung, Stephen J. Fuller, Julian A. Barden, Alison L. Clarke, Steven Petrou, James S. Wiley. An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 31287-31295.
- 72) Sébastien Roger, Zhu-ZhongMei, Jocelyn M. Baldwin, Li Dong, Helen Bradley, Stephen A. Baldwin, Annmarie Surprenant, Lin-Hua Jiang. Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J. Psychiatr. Res.* **2010**, 44, 347-355.
- 73) Xiong Cao, Liang-Ping Li, Qian Wang, Qiong Wu, Hong-Hai Hu, Meng Zhang, Ying-Ying Fang, Jie Zhang, Shu-Ji Li, Wen-Chao Xiong, Hua-Cheng Yan, Yu-Bo Gao, Ji-Hong Liu, Xiao-Wen Li, Li-Rong Sun, Yuan-Ning Zeng, Xin-Hong Zhu, Tian-Ming Gao. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat. Med.* **2013**, 19, 773-777.
- 74) Masaaki Iwata, Kristie T. Ota, Xiao-Yuan Li, Fumika Sakaue, Nanxin Li, Sophie Dutheil, Mounira Banasr, Vanja Duric, Takehiko Yamanashi, Koichi Kaneko, Kurt Rasmussen, Andrew Glasebrook, Anja Koester, Dekun Song, Kenneth A. Jones, Stevin Zorn, Gennady Smagin,

- Ronald S. Duman. Psychological stress activates the inflammasome *via* release of adenosine triphosphate and stimulation of the purinergic type 2X7 receptor. *Biol. Psychiatry* **2016**, 80, 12-22.
- 75) Kenneth H. Jones, James A. Senft. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, 33, 77-79.
  - 76) Yuuka Kido, Chiyo Kawahara, Yasuko Terai, Akihiro Ohishi, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Yosuke Kamatsuka, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Regulation of activity of P2X7 receptor by its splice variants in cultured mouse astrocytes. *Glia* **2014**, 62, 440-451.
  - 77) Stefania Muzzachi, Antonella Blasi, Elena Ciani, Maria Favia, Rosa A. Cardone, Domenico Marzulli, Stephan J. Reshkin, Giulia Merizzi, Valeria Casavola, Antonio Soleti, Lorenzo Guerra. MED1101: a new dialdehydic compound regulating P2X7 receptor cell surface expression in U937 cells. *Biol. Cell.* **2013**, 105, 399-413.
  - 78) Elena Adinolfi, Maria Cirillo, Ronja Woltersdorf, Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi, Patrizia Pellegatti, Maria Giulia Callegari, Doriana Sandonà, Fritz Markwardt, Günther Schmalzing, Francesco Di Virgilio. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J.* **2010**, 24, 3393-3404.
  - 79) Lars-Olof Ronnevi. Origin of the glial processes responsible for the spontaneous postnatal phagocytosis of boutons on cat spinal motoneurons. *Cell. Tissue Res.* **1978**, 189, 203-217.
  - 80) G. H. Chang, N. M. Barbaro, R. O. Pieper. Phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. *Neuro Oncol.* **2000**, 2, 174-183.
  - 81) Camilla Lööf, Lars Hillered, Ted Ebendal, Anna Erlandsson. Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS One* **2012**, 7, e33090.
  - 82) R. A. Worthington, M. L. Smart, B. J. Gu, D. A. Williams, S. Petrou, J. S. Wiley, J. A. Barden. Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS Lett.* **2002**, 512, 43-46.
  - 83) Ronald Sluyter, Leanne Stokes, Stephen J. Fuller, Kristen K. Skarratt, Ben J. Gu, James S. Wiley. Functional significance of P2RX7 polymorphisms associated with affective mood disorders. *J. Psychiatr. Res.* **2010**, 44, 1116-1117.
  - 84) Pia Soronen, Outi Mantere, Tarja Melartin, Kirsi Suominen, Maria Vuorilehto, Heikki Ryttsälä, Petri Arvilommi, Irina Holma, Mikael Holma, Pekka Jylhä, Hanna M. Valtonen, Jari Haukka, Erkki Isometsä, Tiina Paunio. P2RX7 gene is associated consistently with mood disorders and predicts clinical outcome in three clinical cohorts. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **2011**, 156B, 435-447.
  - 85) Bo Fan, Shuangmei Liu, Changshui Xu, Jun Liu, Fanjun Kong, Guilin Li, Chunping Zhang, Yun Gao, Hong Xu, Shicheng Yu, Chaoran Zheng, Lichao Peng, Miaomiao Song, Bing Wu, Qiulan Lv, Lifang Zou, Mofeng Ying, Xi Zhang, Shangdong Liang. The role of P2X7 receptor in PC12 cells after exposure to oxygen-glucose deprivation. *Auton. Neurosci.* **2014**, 185, 36-42.



- 86) Phuong Dao-Ung, Kristen K. Skarratt, Stephen J. Fuller, Leanne Stokes. Paroxetine suppresses recombinant human P2X7 responses. *Purinergic Signal*. **2015**, 11, 481-490.
- 87) Wei Wang, Zheng-Hua Xiang, Chun-Lei Jiang, Wei-Zhi Liu, Zhi-Lei Shang. Effects of antidepressants on P2X7 receptors. *Psychiatry Res*. **2016**, 242, 281-287.
- 88) Elham Ranjbar, Masoumeh Sabet Kasaei, Minoos Mohammad-Shirazi, Javad Nasrollahzadeh, Bahram Rashidkhani, Jamal Shams, Seyed-Ali Mostafavi, Mohammad Reza Mohammadi. Effects of zinc supplementation in patients with major depression: a randomized clinical trial. *Iran. J. Psychiatry* **2013**, 8, 73-79.

## 研究業績目録

### 学位論文の基礎となる報文及び該当する章

- 1) Takahiro Furuta, Chiaki Ohshima, Mayu Matsumura, Naoto Takebayashi, Emi Hirota, Toshiki Mawaribuchi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Oxidative stress upregulates zinc uptake activity via Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1) in cultured mouse astrocytes. *Life Sci.* **2016**, 151, 305-312. [第 2 章]
- 2) Takahiro Furuta, Ayumi Mukai, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Oxidative stress-induced increase of intracellular zinc in astrocytes decreases their functional expression of P2X7 receptors and engulfing activity. *Metallomics* **2017**, 9, 1839-1851. [第 1 章、第 3 章]

### その他の原著論文

- 1) Yousuke Kamatsuka, Manami Fukagawa, Takahiro Furuta, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Astrocytes, but not neurons, exhibit constitutive activation of P2X7 receptors in mouse acute cortical slices under non-stimulated resting conditions. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, 37, 1958-1962.
- 2) Shohei Segawa, Takeshi Nishiura, Takahiro Furuta, Yuki Ohsato, Misaki Tani, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Zinc is released by cultured astrocytes as a gliotransmitter under hypoosmotic stress-loaded conditions and regulates microglial activity. *Life Sci.* **2014**, 94, 137-144.
- 3) Akihiro Ohishi, Yuka Keno, Ayaka Marumiya, Yugo Sudo, Yukako Uda, Kinuyo Matsuda, Yuki Morita, Takahiro Furuta, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Expression level of P2X7 receptor is a determinant of ATP-induced death of mouse cultured neurons. *Neuroscience* **2016**, 319, 35-45.

### 発表学会

- 1) 古田能裕、須藤嵩史、向井あゆみ、山本美菜、西田健太郎、長澤一樹: 活性化アストロサイトにおける P2X7 受容体の機能的発現変動について. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会 合同年会 (奈良) 2014. 9.
- 2) 山本美菜、古田能裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける engulfment 活性の低下は P2X7 受容体の局在変化に起因する. 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014. 10.
- 3) 向井あゆみ、古田能裕、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける P2X7 受容体の機能低下は細胞内遊離型亜鉛の増大に起因する. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015. 3.
- 4) 古田能裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷により増大した細胞内遊離型亜鉛はアストロサイトにおける P2X7 受容体機能を低下させる. 第 5 回 4 大学連携研究フォーラム (京都工芸繊維大学、京都府立医科大学、京都府立大学、京都薬科大学) (京

都) 2015. 11.

- 5) 古田能裕、大嶋千晶、竹林直人、松村真裕、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷されたアストロサイトは細胞膜における ZIP1 の発現増加を介して亜鉛クリアランスを促進させる. 第 58 回日本神経化学学会大会 (埼玉) 2015. 9.
- 6) 古田能裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける細胞内遊離型亜鉛の増大は P2X7 受容体の機能的発現を制御する. 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2015. 3.
- 7) 古田能裕、向井あゆみ、山本美菜、須藤嵩史、大石晃弘、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷によりアストロサイトにおける P2X7 受容体の機能的発現は減少する. 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 (福岡) 2016. 9.
- 8) 古田能裕、向井あゆみ、大石晃弘、西田健太郎、長澤一樹: 酸化ストレス負荷により増加したアストロサイト細胞内遊離型亜鉛は P2X7 受容体の機能的発現低下を介してその食食活性を低下させる. メタルバイオサイエンス研究会 2017 (岡山) 2017. 10.