

中枢神経系における亜鉛を介した
グリア細胞機能連関に関する研究

2015 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

瀬川 将平

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) 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*, **59**, 1933-1945 (2011). [第 2 章]
- 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.*, **94**, 137-144 (2014). [第 1 章]
- 3) Shohei Segawa, Makiko Shibamoto, Mikayo Ogawa, Saori Miyake, Kaho Mizumoto, Ohishi Akihiro, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, The effect of divalent metal cations on zinc uptake by mouse Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1). *Life Sci.*, **113**, 40-44 (2014). [第 3 章]
- 4) Shohei Segawa, Nao Tatsumi, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Characterization of zinc uptake by mouse primary cultured astrocytes and microglia. *Metallomics*, **7**, 1067-1077 (2015). [第 3 章]

課程博士学位論文 内容の要旨

氏名（英字名） 瀬川 将平 (Shohei Segawa)

学位論文題目 中枢神経系における亜鉛を介したグリア細胞機能連関に関する研究

脳神経系細胞は神経及びグリオ伝達物質などを介して機能的に連関することで神経活動の恒常性を維持している。亜鉛は、細胞のシグナル伝達や種々の酵素の活性調節に不可欠な必須微量元素であるが、脳内ではグルタミン酸神経細胞から放出される神経伝達物質として機能し、シナプス可塑性などにおいて重要な役割を担っている。この亜鉛放出は、虚血や外傷などの脳傷害時において過剰となり、神経細胞死を惹起するとともに、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの活性化を介して脳傷害を増悪するとされている。したがって、脳神経系における亜鉛動態は厳密に制御される必要がある。脳内において最も多い細胞種であるアストロサイトは、神経細胞の機能を支持する細胞として捉えられてきたが、ATP などのグリオ伝達物質の放出及びクリアランスを介して神経活動を積極的に制御することが明らかとなりつつある。近年、アストロサイトは、酸化ストレスなどの負荷により細胞内遊離型亜鉛レベルが上昇することが報告された。このことは、アストロサイトがストレス負荷時に細胞外へ亜鉛を放出する可能性を示唆している。また、細胞外へ放出された亜鉛は、脳内恒常性を維持するために速やかにクリアランスされる必要があり、それにグリア細胞が関与する可能性が考えられるものの、脳神経系細胞による亜鉛クリアランス機構に関する情報は乏しいのが現状である。そこで本研究では、中枢神経系における亜鉛を介したアストロサイトとミクログリアとの機能連関を明らかにすることを目的として、これらグリア細胞における亜鉛の放出及び取り込みについて精査し、以下の成績を得た。

1. 低浸透圧処理アストロサイトからの亜鉛放出及びそれによるミクログリアの活性化

近年、肝性脳症モデルである低浸透圧ストレスを負荷したアストロサイトにおいて、酸化ストレスの誘発に伴い細胞内遊離型亜鉛レベルが上昇することが明らかにされたが、細胞外の亜鉛レベルへの影響は不明である。そこでまず、アストロサイトがストレス負荷時に細胞外に亜鉛を放出するかどうかについて検討した。低浸透圧培地に曝露されたアストロサイトにおいて、細胞内遊離型亜鉛レベルは既報と同様に上昇し、このときの細胞外亜鉛レベルは浸透圧の低下に伴って上昇した。次に、低浸透圧処理した培養アストロサイトから得られた上清をミクログリアに添加したところ、ミクログリアの顕著な形態変化及び poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) の活性化が惹起され、これらの変化は細胞外亜鉛キレート剤である CaEDTA でその上清を前処理することによりほぼ完全に抑制された。以上の結果より、低浸透圧ストレス負荷されたアストロサイトは細胞外に亜鉛を放出し、この亜鉛はミクログリアの活性化を惹起することが明らかとなった。したがって、亜鉛は神経伝達物質としてのみならず、アストロサイトから放出されるグリオ伝達物質としてミクログリアの活性制御に寄与することが示された。

2. 亜鉛誘発性ミクログリア活性化機構

従来、ミクログリアの活性化制御因子は、ATP や UDP などのヌクレオチドとされてきた。これに対し著者の研究室では、ミクログリアは亜鉛によっても活性化されることを明らかにした。しかしながら、既知のヌクレオチドを介したミクログリア活性制御機構との連関などは不明であった。そこで、亜鉛によるミクログリアの活性化機構を精査した。亜鉛によるミクログリアの活性化は、細胞を予め細胞内亜鉛キレート剤である TPEN で処理することによってほぼ完全に抑制されたことから、ミクログリアの活性化において亜鉛は細胞内に取り込まれることが必要であることが分かった。この亜鉛によるミクログリアの活性化

にヌクレオチドが関与するか否かを調べるために、亜鉛刺激された培養ミクログリアの細胞外液中の ATP 量を測定した。その結果、亜鉛処理群の細胞外 ATP 濃度はコントロール群のそれと比較して有意に高かったが、hemichannel 阻害剤である carbenoxolone 処理群では細胞外 ATP 濃度に変化はなく、さらにミクログリアの活性化も認められなかった。そこでミクログリアにおけるヌクレオチド P2 受容体の発現を PCR 法により調べたところ、P2X7 受容体を含む種々の P2 受容体の発現が認められ、さらに亜鉛によるミクログリアの活性化は、P2X7 受容体選択的アンタゴニストである oxATP によって抑制された。ミクログリアの活性化は選択的 P2X7 受容体アゴニスト BzATP によっても惹起され、それは亜鉛の場合と同様に、NADPH oxidase 及び PARP 活性化を介したものであった。以上の結果から、亜鉛によるミクログリアの活性化は、細胞内への亜鉛流入、hemichannel を介した ATP の細胞外放出、オートクリン／パラクリンの P2X7 受容体の活性化、そして NADPH oxidase 及び PARP の活性化を介することが示された。したがって、亜鉛は既知のヌクレオチド-P2 受容体を介したミクログリア活性制御の上流に位置することが明らかとなった。

3. アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛輸送特性の比較

ここまでの検討より、亜鉛は神経伝達物質としてのみならずグリオ伝達物質としても機能することが示された。このことは脳神経系細胞外における亜鉛クリアランス機構が脳内恒常性維持に必須であることを指摘している。そこで、アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛取り込み特性を検討した。両細胞による亜鉛取り込みは時間及び濃度依存的であり、それはいずれの細胞においても少なくとも高親和性及び低親和性コンポーネントの 2 種類の輸送系を介することが分かった。両細胞における亜鉛取り込み機構について検討したところ、高親和性コンポーネントについては同定できなかったが、低親和性コンポーネントは、亜鉛トランスポータ ZIP ファミリーの発現プロファイル解析、亜鉛取り込みの阻害実験、RNA 干渉によるノックダウン実験、強制発現細胞を用いた実験の結果、ZIP1 であることが分かった。次に、両細胞における亜鉛取り込み効率を cell-to-medium concentration (C/M) 比で比較すると、初期取り込み相でのそれはミクログリアの方がアストロサイトよりも大きく、これは輸送系を介した取り込みクリアランス V_{\max}/K_m 値及び ZIP1 タンパク質発現量の差異と対応していた。したがって、両細胞による亜鉛取り込みは主に ZIP1 などの亜鉛輸送系を介したものであるが、その効率はミクログリアにおいて高く、これは亜鉛がミクログリア内に移行して機能する情報伝達物質であるため、ZIP1 などの輸送系を介して効率的に取り込まれる必要があることを意味するものと考えられる。これに対し、亜鉛取り込みの定常状態 C/M 比は両細胞間で差はなかった。これは細胞内に取り込まれた亜鉛の細胞内小器官への移行並びにメタロチオネインなどとの結合によって細胞内遊離型亜鉛レベルが速やかに低下するため、促進拡散系トランスポータである ZIP ファミリーの取り込み活性は定常状態での亜鉛の細胞内取り込み量に影響しないということによって説明できる。このこととアストロサイトが脳内で最も多い細胞種であり、さらにそのメタロチオネイン発現量が多いという知見を考え併せると、脳神経系細胞外に放出された亜鉛のクリアランスは主としてアストロサイトによって行われるものと考察される。

以上を総括すると、①ストレス負荷時にアストロサイトはグリオ伝達物質として亜鉛を放出すること、②ミクログリアは亜鉛を ZIP1 などの輸送系を介して細胞内に取り込み、ATP/P2X7 受容体シグナリングを介して活性化すること、並びに ③アストロサイトはミクログリアと同様の亜鉛取り込み機構を有し、その取り込み効率は低いものの、脳神経系細胞外の亜鉛クリアランスにおいて中心的役割を担うことが示された。したがって、亜鉛は脳内恒常性維持において重要な役割を担うアストロサイトとミクログリアの機能的連関を制御するグリオ伝達物質であるというその新たな生理的意義が見出され、これは脳神経系ネットワークの破綻に起因する神経障害に対する新たな治療戦略を見出すための有益な知見である。

目 次

序 論.....	1
 第 1 章 低浸透圧処理アストロサイトからの亜鉛放出及びそれによるミクログリアの活性化	
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. 低浸透圧処理	7
4. 細胞外 ATP 濃度の測定	7
5. 細胞生存率の測定	7
6. 亜鉛レベルの評価	7
7. ミクログリア活性化の評価	8
8. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).....	8
9. 統計学的処理	9
実験成績.....	10
1. 低浸透圧ストレス負荷条件の確立	10
2. 低浸透圧負荷によるアストロサイト細胞内及び細胞外の亜鉛レベルの増加	11
3. 低浸透圧ストレス負荷アストロサイトから得た ACM によるミクログリアの活性化	12
4. 低浸透圧ストレス負荷によるアストロサイト細胞内外亜鉛レベル増加に対する細胞内亜鉛 キレート剤の影響	13
5. 低浸透圧ストレス負荷によるアストロサイト細胞内亜鉛レベル増加に対する NOS 阻害剤 及び細胞外亜鉛キレート剤の影響	14
6. 低浸透圧ストレス負荷したアストロサイト細胞外における亜鉛レベル増加に対するエキソ サイトーシス及び hemichannel 阻害剤の影響.....	15
7. 低浸透圧ストレス負荷したアストロサイトにおける ZnT-1 の発現.....	16
考 察.....	17
 第 2 章 亜鉛誘発性ミクログリア活性化機構	
緒 言.....	21

実験材料及び方法.....	22
1. 試薬	22
2. 細胞培養	22
3. Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR).....	22
4. 亜鉛によるミクログリア活性化の評価	24
5. Superoxide anion の産生	24
6. 細胞外 ATP 濃度の測定	24
7. 統計学的処理	25
実験成績.....	26
1. 細胞処理条件	26
2. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する細胞内亜鉛キレート剤の影響	27
3. ミクログリアにおける P2 受容体の mRNA 発現プロファイル	28
4. 亜鉛による細胞外 ATP 放出への細胞内亜鉛キレート剤と CFTR 及び hemichannel 阻害剤の 影響	29
5. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する CFTR 及び hemichannel 阻害剤の影響.....	30
6. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する P2 受容体アンタゴニストの影響	31
7. P2X7 受容体アゴニストによるミクログリアの活性化における NADPH oxidase 及び PARP の影響	31
考 察.....	33

第3章 アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛輸送特性の比較

緒 言.....	37
実験材料及び方法.....	38
1. 試薬	38
2. 細胞培養	38
3. 取り込み実験	38
4. マウス ZIP1 (mZIP1) 過剰発現細胞.....	40
5. 免疫細胞染色	40
6. RNA 干渉.....	41
7. Real-time PCR	41

8. ウェスタンブロット	42
9. 速度論的解析	43
10. 統計学的処理	43
実験成績.....	44
1. ^{65}Zn 取り込み特性	44
2. 亜鉛取り込みにおける ZIP ファミリーの関与	45
3. ZIP1 の機能評価	47
4. ZIP1 を介した亜鉛取り込みに対する各種二価金属イオンの影響	50
5. 亜鉛取り込みに対するニッケルの影響	51
6. 亜鉛取り込みに対する ZIP1 ノックダウンの影響	53
7. 亜鉛取り込みに対する L 型カルシウムチャネル阻害剤、グルタミン酸受容体アゴニスト及びエンドサイトーシス阻害剤の影響	56
考 察.....	56
総 括.....	60
謝 辞.....	61
引用文献.....	63

【略語表】

ACM	astrocytic conditioned medium
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ara-C	cytosine-1- β -D(+)-arabinofuranoside
ARL 67156	6-N,N-diethyl-D- β - γ -dibromomethylene adenosine triphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BBG	brilliant blue G
BFA	brefeldin A
BSA	bovine serum albumin
BSS	balanced salt solution
BzATP	2'(3')-O-(4-benzoyl-benzoyl)adenosine 5'-triphosphate
Ca(II)-EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N',-tetraacetic acid, calcium(II), disodium salt, dehydrate
CBX	carbenoxolone
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
C/M 比	細胞内濃縮率 (cell-to-medium concentration ratio)
DFP	diisopropyl fluorophosphate
DHE	dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMT	divalent metal transporter
DNase	deoxyribonuclease
DTT	dithiothreitol
EGTA	O,O'-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	glybenclamide
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HRP	horse-radish peroxidase
ICP-MS	誘導結合プラズマ質量分析計 (inductively coupled plasma mass spectrometry)
IL	interleukin
iNOS	誘導性 NO 合成酵素 (inducible nitric oxide synthase)
K_m	Michaelis 定数
LDH	lactose dehydrogenase
L-NAME	N _ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LPS	lipopolysaccharide
MTF-1	metal-regulatory transcription factor-1
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form)
NADP	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate
NADPH	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (reduced form)
NG	Newport Green DCF diacetate
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NOS	NO 合成酵素 (nitric oxide synthase)
NTPDase	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase
oxATP	oxidized adenosine 5'-triphosphate
PAR	poly(ADP-ribose) polymer
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	0.1% Tween-20 含有 phosphate-buffered saline
PEI	polyethyleneimine
PFA	paraformaldehyde
PI	propidium iodide
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPADS	pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid)tetrasodium salt hydrate
PVDF	polyvinylidene difluoride
RB2	reactive blue 2
Real-time PCR	real-time polymerase chain reaction

ROS	活性酸素種 (reactive oxygen species)
RNS	活性窒素種 (reactive nitrogen species)
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S.D.	標準偏差 (standard deviation)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
UDP	uridine diphosphate
V_{\max}	最大取り込み速度
ZIP	Zrt- and Irt-like proteins
Zn(II)-EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N',-tetraacetic acid, zinc(II), disodium salt, dehydrate
ZnT-1	zinc transporter 1

序 論

脳神経系における神経伝達物質などを介した情報伝達は、その機能発現において中心的役割を担っており、それらの放出に加え、細胞間隙からの除去を含めた動態制御が重要である。例えば、グルタミン酸神経の前シナプス細胞から放出されたグルタミン酸は、後シナプス細胞に興奮を伝達した後、速やかにアストロサイトに取り込まれる (Rose *et al.*, 2013)。また ATP は、グルタミン酸と同様に神経細胞の興奮によって細胞外に放出された後、神経細胞やグリア細胞に発現する ecto-nucleotidase によって adenosine に代謝され、それらの細胞に取り込まれる (Pankratov *et al.*, 2006; Ruby *et al.*, 2014)。このような神経伝達物質の脳神経系細胞外における動態制御は、虚血／再還流などのストレス負荷時において破綻し、神経細胞死が惹起される (Barreto *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2015)。近年、グルタミン酸や ATP はアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞からも放出されることが明らかとなり (Bennett *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2004; Takeuchi and Suzumura, 2014)、グリオ伝達物質として脳内恒常性維持や脳機能発現に積極的に関与すると考えられるようになった。

必須微量元素である亜鉛は、生体内で細胞のシグナル伝達や酵素の構造形成、維持などの数多くの機能制御に関与しており、その欠乏は味覚障害、免疫不全、成長、皮膚障害などを引き起こす (Prasad, 1995; Vallee and Auld, 1993)。中枢神経系において、亜鉛は主にグルタミン酸神経の前シナプス小胞内に亜鉛イオンの状態でグルタミン酸と共に蓄積されており、神経伝達物質として機能し、シナプス可塑性などにおいて重要な役割を担う (Beaulieu *et al.*, 1992; Bitanhirwe and Cunningham, 2009; Frederickson *et al.*, 1989; Marger *et al.*, 2014)。一方、脳虚血などの重篤な脳傷害時において、亜鉛はグルタミン酸神経細胞から過剰に放出され、後シナプス側の神経細胞内に取り込まれた後 protein kinase C の活性化を介した NADPH oxidase の活性化により superoxide anion の過剰な産生を惹起する。この過剰な superoxide anion は DNA 傷害を引き起こすため、その修復酵素である poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) が活性化され (Colvin, 2002; Kim and Koh, 2002; Noh *et al.*, 1999; Noh and Koh, 2000)、好気呼吸で重要な nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) を多量に消費することにより、神経細胞死を引き起こす (Kim and Koh, 2002)。In vivo 実験において、このような神経細胞死は亜鉛キレート剤 CaEDTA を予め脳内に投与することにより抑制されることから (Calderone *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 1996)、ストレス負荷による脳神経細胞死の誘発において亜鉛は中心的役割を担うと考えられる。

脳内で最も多い細胞種であるアストロサイトは (Koizumi and Inoue, 2004)、神経細胞から細胞間隙に放出されたグルタミン酸を取り込み、それをグルタミンに変換して神経細胞に供給するなどして脳内恒常性維持に寄与する (Rose *et al.*, 2013)。近年、アストロサイトに対する過剰な酸化ストレスの負荷

は、その細胞内遊離型亜鉛レベルを増大し、それにより細胞死が惹起されることが報告された (Lee *et al.*, 2014)。また、ミクログリアは、感染や組織傷害などによって活性化し、生体異物や死細胞を貪食する脳内免疫担当細胞である (Lynch, 2009)。これまでこのミクログリアの活性化は、死細胞などに由来する ATP や UDP などのヌクレオチドによって惹起されるとされてきたが (Koizumi *et al.*, 2007; Ohsawa *et al.*, 2007)、グルタミン酸神経から過剰に放出される亜鉛がその活性化因子として機能し、その脳神経系細胞外からの除去は、ミクログリアの過剰な活性化を抑制することが報告された (Kauppinen *et al.*, 2008)。これらのことから、亜鉛は神経細胞のみならず、グリア細胞も含めた脳神経系の恒常性維持において中心的役割を担う情報伝達分子であると考えられ、その動態は厳密に制御される必要があることが指摘される。しかしながら、脳神経系細胞、特にグリア細胞における亜鉛の放出及び取り込み機構に関する情報は乏しいのが現状である。

そこで本稿では、脳内亜鉛動態制御におけるアストロサイトとミクログリアの役割並びにそれらの機能的連関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 低浸透圧処理アストロサイトからの亜鉛放出及びそれによるミクログリアの活性化

緒 言

亜鉛は神経伝達物質として機能するが、虚血などの重篤な脳傷害時にはその放出が過剰となり、神経細胞死を引き起こすと共に、脳内免疫担当細胞であるミクログリアを活性化することで、脳傷害の増悪に寄与する (Block *et al.*, 2007; Higashi *et al.*, 2011; Kreutzberg, 1996)。脳傷害後における脳内の遊離型亜鉛濃度は二相性の上昇を示すことが知られている (Aguilar-Alonso *et al.*, 2008; Kitamura *et al.*, 2006)。脳傷害直後の一過性の亜鉛濃度上昇は神経細胞のシナプス小胞から放出される亜鉛に由来するとされている (Frederickson *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 1996)。一方、脳傷害 6 時間以降においても遅発性の亜鉛濃度の上昇が観察されるが (Aguilar-Alonso *et al.*, 2008)、これが神経細胞に由来するものであるかは明らかとなっていない。

アストロサイトは、細胞数としては神経細胞の 10 倍近く存在し (Koizumi and Inoue, 2004)、カルシウム伝播や (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Verkhratsky and Kettenmann, 1996)、ATP やグルタミン酸などのグリオ伝達物質の放出などを介して、脳神経系細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしている (Parpure *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003)。近年、肝性脳症モデルの一つである低浸透圧ストレスをアストロサイトに負荷することにより細胞内遊離型亜鉛レベルが上昇し、メタロチオネインの発現を亢進することで、細胞の酸化ストレス抵抗性を増大することが報告された (Kruczek *et al.*, 2009)。このような細胞内遊離型亜鉛レベルの増加は、細胞外への亜鉛の放出に繋がる可能性が考えられるが、その細胞外亜鉛動態への影響の有無については不明である。

そこで著者は、脳神経系細胞外の亜鉛の供給源の一つとしてアストロサイトに着目し、アストロサイトがストレス負荷時に細胞外に亜鉛を放出し、放出された亜鉛がグリオ伝達物質として機能するか否かを明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

実験材料及び方法

1. 試薬

Newport Green DCF diacetate (NG) は Life TechnologiesTM から、cytosine-1- β -D(+)-arabinofuranoside (Ara-C), nitric acid (超微量分析用), 多元素混合標準液 BM (Multielement Std. Soln. BM), N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN), ethylenediamine-N,N,N',N',-tetraacetic acid, calcium(II), disodium salt, dehydrate (Ca(II)-EDTA), ethylenediamine-N,N,N',N',-tetraacetic acid, zinc(II), disodium salt, dehydrate (Zn(II)-EDTA) 及び brefeldin A (BFA) は和光純薬工業から、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) 及び Hoechst 33258 は同仁化学から、hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (NADP), N^o-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), carbenoxolone (CBX), papain, deoxyribonuclease (DNase), adenosine 5'-triphosphate (ATP) 及び bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は、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

2-1. 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; NaCl 136.9 mM, KCl 5.4 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM, D-glucose 5.56 mM, HEPES 25 mM) 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、4°C、3,000 rpm の条件下で 5 分間の遠心分離を行った。上清を除去した後、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、単位容積あたりの細胞を計数した。培養液中の細胞を 7.5×10^4 cells/mL に調製し、6 又は 24 well cell culture plate (Corning) に播種後、37°C、5% CO₂ 気流下にて培養した。培養開始後、3 及び 10 日目に 10% FBS 及び 2 mM L-glutamine 含有 EMEM で培地交換を行った。培養開始後 13-15 日目にて培地を穏やかに振とうさせ、浮遊細胞を採取し、24 well cell culture plate に再び播種し、ミクログリアの実験には再播種後 2 日間培養したものをを用いた。また、浮遊細胞を採取後の培地は 20 μ M Ara-C を作用させて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、アストロサイトの実験には 20-40 日間培養したものを用いた。なお、本実験プロトコールは、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。

2-2. 純度

2-1 項にて得られたアストロサイト及びミクログリアの純度はそれぞれの指標タンパク質である glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び Iba-1 に対する免疫細胞染色により評価した。

免疫細胞染色では、細胞を 0.1% sodium azide, 0.05% Triton X-100 (ICN Biochemicals) 含有 phosphate-buffered saline (PBS; 136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) で洗浄し、室温にて 30 分間 blocking を行った。Blocking buffer は 0.1% sodium azide, 0.05% Triton X-100, 1% BSA 含有 PBS を用いた。その後細胞を blocking buffer で調製した anti-GFAP mouse monoclonal antibody (1:1000; #G3893; TREVIGEN) 及び anti-Iba-1 rabbit polyclonal antibody (1:1000; #019-19741; 和光純薬工業) を用いて 4°C にて一晩反応した。その後、細胞は 0.1% sodium azide, 0.05% Triton X-100 含有 PBS で洗浄し、blocking buffer で調製した Alexa Fluor[®] 488 標識 goat anti-mouse IgG antibody (1:1000; #A11029; Life TechnologiesTM)、Alexa Fluor[®] 546 標識 goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000; #A11035; Life TechnologiesTM) を室温、遮光下にて 2 時間反応させた。その際、核は Hoechst 33258 (10 µg/mL) にて染色した。その後、細胞を 0.1% sodium azide, 0.05% Triton X-100 含有 PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡下 (IX51; Olympus) にて、観察及び Q-capture (日本ローパー) にて撮影した。

得られた結果を Fig. 1 に示す。培養アストロサイト及びミクログリアにおいて、それぞれミクログリア及びアストロサイトの混入はほとんど認められず、そ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 (Table 1)。

Table 1. Purity of the Astrocytes and Microglia in Their Culture Systems

	GFAP-positive cells (%)	Iba-1-positive cells (%)
Astrocytes	97.8 ± 1.3	2.2 ± 1.3
Microglia	0.5 ± 0.4	99.5 ± 0.4

Purity of astrocytes and microglia in their culture system were calculated based on the immunocytochemical detection of GFAP- and Iba-1-positive cells, respectively, to total cell numbers indicated by Hoechst 33258 staining in each culture shown in Fig. 1. Each value represents the mean ± S.D. (N = 3). This table was cited from Table 1 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

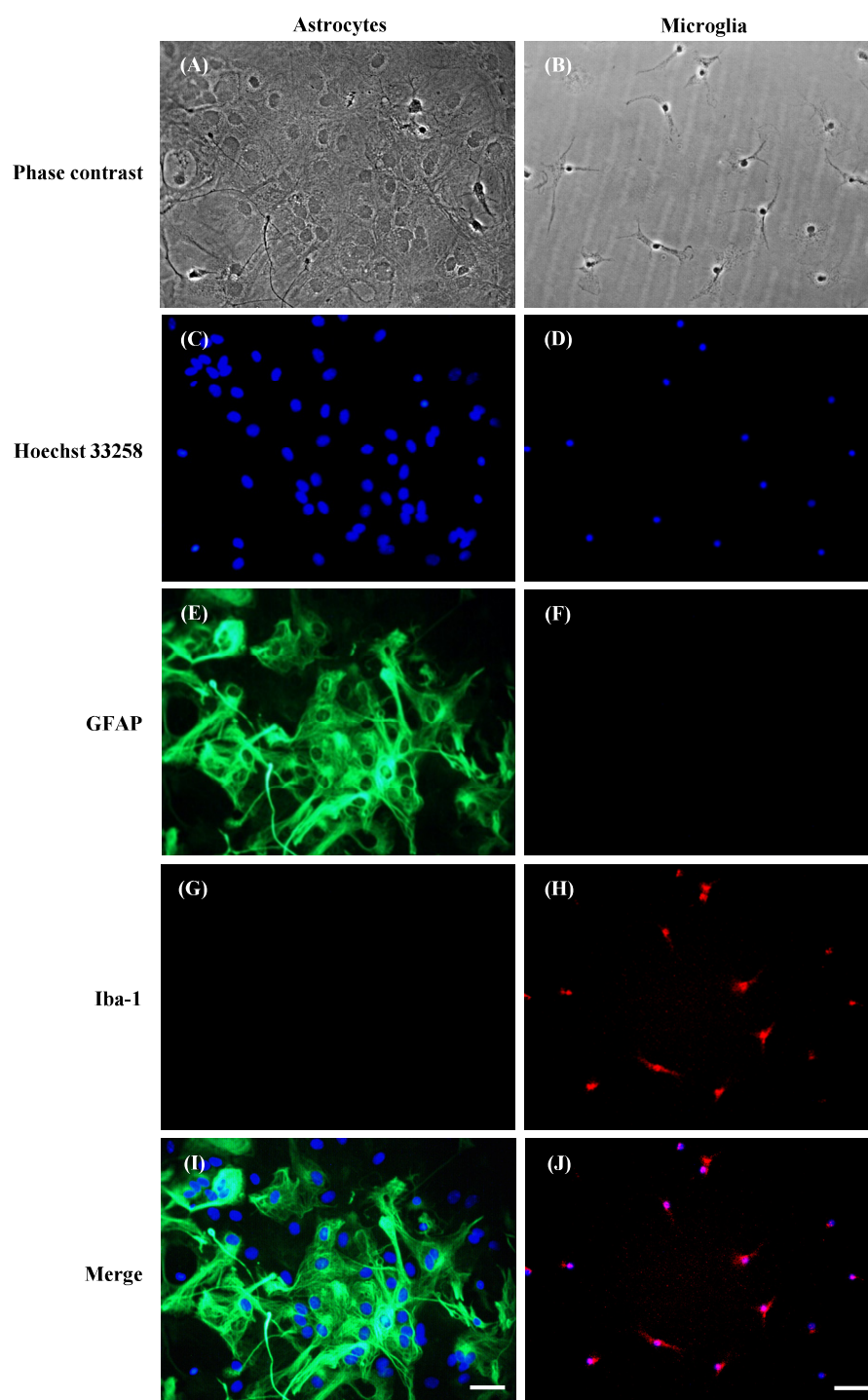


Fig. 1. Fluorescence Images of Double-label Immunocytochemistry for GFAP and Iba-1 in Mouse Astrocytes and Microglia Cultures

Panels A and B show representative phase-contrast images of astrocytes and microglia in their culture systems, respectively. Photomicrographs in panels C and D, E and G, and F and H showed Hoechst 33258 staining of nuclei, the immunostaining for GFAP and Iba-1 in astrocytes and microglia cultures, respectively. Merged images of GFAP (panel E and G) and Iba-1 (panel F and H) with Hoechst 33258 staining (panel C and D, respectively) are shown in panels I and J, respectively. Scale bar = 50 μ m. This figure was cited from Fig. 1 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

3. 低浸透圧処理

実験用緩衝液には、5% CO₂ を飽和させた balanced salt solution (BSS) (NaCl 134 mM, KCl 3.1 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 0.25 mM, NaHCO₃ 15.7 mM, D-glucose 2.0 mM, pH 7.2) を用いた。低浸透圧処理は、Na⁺の含有量を変化させることで種々の浸透圧に調製した低浸透圧 BSS を用いた。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、種々の浸透圧に調製した BSS を添加することにより反応を開始した。一定時間経過後、その上清を採取し、95°C、5 分間で熱不活性化した。その後、4°C、14,000 rpm で 1 分間遠心分離し、得られた上清をアストロサイト培養上清 (astrocytic conditioned medium (ACM)) として各実験に用いた。

4. 細胞外 ATP 濃度の測定

細胞外 ATP 濃度は、glucose と hexokinase の酵素基質反応により測定した (Corriden *et al.*, 2007)。ACM に対し 2 units/ml hexokinase, 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2 mM NADP 及び 10 mM D-glucose 含有 HBSS を添加し、37°C にて 20 分間インキュベーションした。酵素基質反応により還元型 NADP (NADPH) が ATP と等量生成されることを利用し、NADPH の蛍光強度を励起波長 340 nm 及び蛍光波長 460 nm にてマイクロプレートリーダー (ARVO_{MX/Light}; PerkinElmer) を用いて測定した。得られた測定値は、予め調製し、試料と同時に測定した ATP 標準液のそれらから作成した検量線に基づき ATP 濃度に換算した。

5. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は lactate dehydrogenase (LDH) 法により評価した。アストロサイトは BSS に置換後、低張 BSS を添加し一定時間反応させた。その上清を採取し、LDH buffer (KH₂PO₄ 0.5 M, K₂HPO₄ 0.5 M, phenol red 0.03 mM, pyruvate 2.5 mM, NADH 0.35 mM) を加え、マイクロプレートリーダーにて波長 380 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、吸光度の単位時間あたりの低下率を求め、それらを対照実験のそれと比較することにより算出した。

6. 亜鉛レベルの評価

6-1. 細胞内亜鉛レベル

細胞内亜鉛レベルは、細胞内の遊離型亜鉛に対する特異的プローブ (Sensi *et al.*, 1997) である NG を用いて検出した。アストロサイトは細胞培養液を除去し、BSS に置換した後、5 µM NG を 30 分間作用させた。その後低張 BSS を添加し一定時間経過後マイクロプレートリーダーを用い励起波長 485 nm

及び蛍光波長 535 nm で蛍光強度を測定した。

6-2. 細胞外亜鉛レベル

細胞外亜鉛レベルは ACM 中の亜鉛を誘導結合プラズマ質量分析装置 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS); ICPM-8500; Shimadzu) を用いて測定することで評価した。ACM 0.7 mL に対し、69%硝酸水溶液 4.3 mL 及び内部標準物質としての 36 µg/mL インジウム 1%硝酸溶液 14.3 µL を添加したものを、ICP-MS 測定用の試料とした。なお、検量線には、7%硝酸により希釈した Multielement Std. Soln. BM を用いた。

7. ミクログリア活性化の評価

7-1. 形態変化

ACM に対し高張 BSS を添加することにより等張化した。その後、得られた上清をミクログリアに添加し 2 時間後に、細胞を固定液 (50% acetone, 50% methanol) で 4°C にて 15 分間固定し、位相差顕微鏡下でその形態を観察した。静止状態にあるミクログリアは、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 (Kauppinen *et al.*, 2008)。

7-2. poly(ADP-ribose) polymer (PAR) の蓄積

ミクログリアにおける PAR の蓄積は、2-2 項と同様に免疫細胞染色により評価した。その際に使用した一次及び二次抗体は、それぞれ anti-poly(ADP-ribose) mouse monoclonal antibody (1:1000; #4335-MC-100; TREVIGEN) 及び Alexa Fluor® 546 標識 goat anti-mouse IgG antibody (1:500; #A11035; Life Technologies™) であった。蛍光顕微鏡下にて得られた写真を用いて、PAR の免疫活性を指標とし、全細胞数に対する PAR 陽性細胞数を基に PAR 陽性細胞率を算出した。

8. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

培養アストロサイトの total RNA は、GeneElute™ Mammalian Total RNA kit (Sigma-Aldrich) を用いて抽出した後、PrimerScript™ 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 real-time PCR を行った。各サンプルの mRNA 発現量は β-actin の mRNA 発現量にて補正した。なお、zinc transporter 1 (ZnT-1) 及び β-actin に対する特異的 primer は Table 2 に

示した。

Table 2. Primer Sets for Real-time PCR Amplification of ZnT-1 and β -actin

Accession number		Primer sequences		Product size
ZnT-1	NM_009579	Forward	5'-ACCAGGAGGAGACCAACACG-3'	87 bp
		Reverse	5'-TTGTCTTCCGCTTCCAGATTG-3'	
β -actin	NM_007393	Forward	5'-AGGTCATCACTATTGGCAACGA-3'	171 bp
		Reverse	5'-CACTTCATTGATGGAATTGAATGTAGTT-3'	

9. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準偏差 (S.D.) にて表示した。有意差検定は、Kauppinen ら (2008) の報告に基づき、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、2 群間比較の場合 Student's *t*-test を、多群間比較の場合は Tukey's test、対照群と処理群の対比較の場合は Dunnett'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. 低浸透圧ストレス負荷条件の確立

今回、培養アストロサイトにおける細胞内遊離型亜鉛レベルを上昇させる処理として、肝性脳症のモデル系として汎用される低浸透圧処理を適用することとした (Kruczek *et al.*, 2009)。まず、Kruczek ら (2009) の報告に基づき、230-314 mOsmol/L の浸透圧に調製した BSS を培養アストロサイトに作用した際のストレス負荷の有無を細胞外への ATP 放出を指標として用い検討した (Fig. 2)。アストロサイト培養系における細胞外 ATP 濃度は、コントロールとしての 314 mOsmol/L の等張 BSS の処理では変化しなかったが、230 mOsmol/L の低浸透圧に調製した BSS を作用した場合には、顕著に増加した (Fig. 2A)。次に、細胞外 ATP 濃度変化の浸透圧依存性を検討したところ、それは 230-314 mOsmol/L の間における浸透圧の低下に伴い増加した (Fig. 2B)。この時のアストロサイト生存率への影響を検討したところ、230 mOsmol/L による低浸透圧処理は 6 時間の曝露によっても細胞外 LDH 量は変化しなかった (Fig. 2C)。これらのことから、230 mOsmol/L の低張 BSS を用いた低浸透圧処理により、アストロサイトに対して細胞死を引き起こすことなくストレスを負荷できることが確認された。

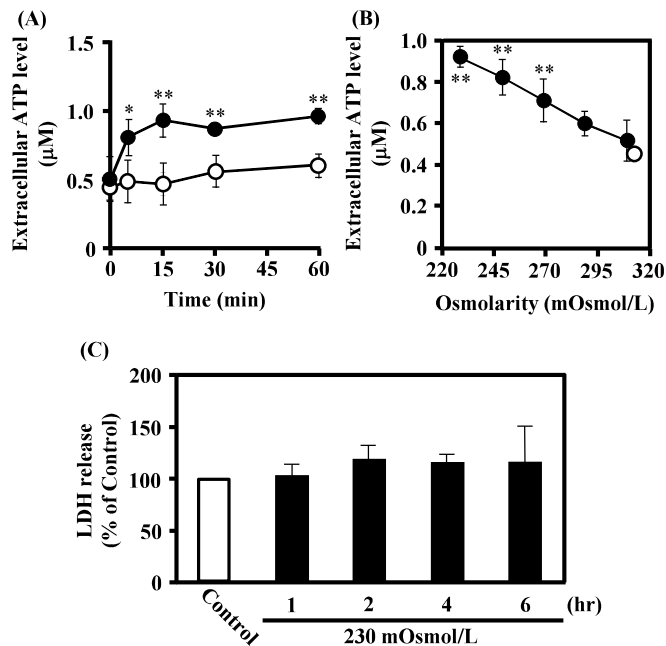


Fig. 2. Effect of Hypoosmotic Treatment on the Extracellular ATP Level and Cell Viability in Astrocytes

(A) After astrocytes had been preincubated in BSS for 10 min, the cells were exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L, open) or hypoosmotic (230 mOsmol/L, closed) BSS for the indicated times. (B) After astrocytes had been preincubated in BSS for 10 min, the cells were exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L) or hypoosmotic (ranging from 310 to 230 mOsmol/L) BSS for 15 min. Thereafter, the extracellular ATP levels in astrocyte cultures were measured. (C) After preincubation in BSS for 10 min, astrocytes were exposed to hypoosmotic BSS (230 mOsmol/L) for the indicated times, and then their viability was determined. Each point/bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from the corresponding values of the normoosmotic group. This figure was cited from Fig. 1 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

2. 低浸透圧負荷によるアストロサイト細胞内及び細胞外の亜鉛レベルの増加

Fig. 3 は、低浸透圧ストレスを負荷したアストロサイト細胞内及び細胞外亜鉛レベルの変化について検討した結果を示す。まず、NG により細胞内遊離型亜鉛レベルを評価したところ、低浸透圧処理後 4 時間から NG シグナルが有意に増加し、処理 6 時間後におけるそのシグナル強度はコントロール群の約 4 倍となった (Fig. 3A)。さらに、この時のアストロサイト培養上清中の亜鉛レベルを測定した結果、コントロール群における細胞外亜鉛レベルは $0.028 \pm 0.009 \mu\text{M}$ であったのに対して、低浸透圧処理 6 時間後の細胞外亜鉛レベルは $0.072 \pm 0.008 \mu\text{M}$ であった (Fig. 3B)。これらの結果から、低浸透圧処理されたアストロサイトの細胞内及び細胞外のいずれにおいても亜鉛レベルが増加することが明らかとなった。

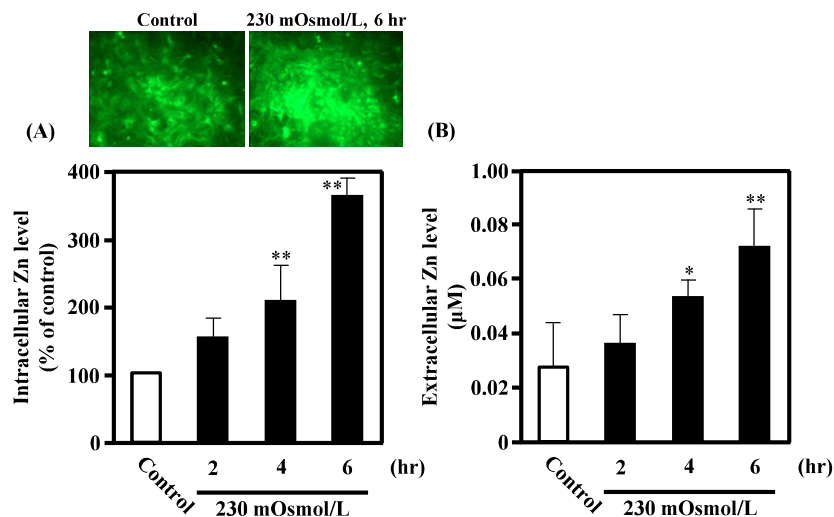


Fig. 3. Effect of Hypoosmotic Treatment on the Intra- or Extracellular Zinc Level in Astrocytes

After astrocytes had been preincubated with 5 μM NG for 30 min, followed by washout, they were exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L) BSS for 6 hr or hypoosmotic (230 mOsmol/L) BSS for 2, 4 or 6 hr. Thereafter, the intra- (A) and extracellular (B) zinc levels were determined. The upper panels in panel A show representative NG fluorescence images of the control and 6 hr-hypoosmotic treatment groups. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. This figure was cited from Fig. 2 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

3. 低浸透圧ストレス負荷アストロサイトから得た ACM によるミクログリアの活性化

230 mOsmol/L 低浸透圧処理群の ACM をミクログリアに曝露し、ミクログリアが活性化するか否かを、その形態変化及び PAR の蓄積に基づき評価した (Fig. 4)。低浸透圧処理群の ACM をミクログリアに添加することによって、“ameboid” 状の形態のミクログリアの割合が増加し、PAR の免疫活性が検出されたミクログリアのそれも同様であった (Fig. 4)。さらに、このようなミクログリアの形態変化及び PAR 蓄積の変化は、低浸透圧処理群の ACM に細胞外亜鉛キレート剤である CaEDTA (Larson *et al.*, 2000) を予め添加することで抑制されたが、亜鉛キレート活性を有さない ZnEDTA (Koh *et al.*, 1996) では影響されなかった (Fig. 4)。これらの結果から、アストロサイトを低浸透圧処理することにより細胞外に亜鉛が放出され、それはミクログリアを活性化することが示された。

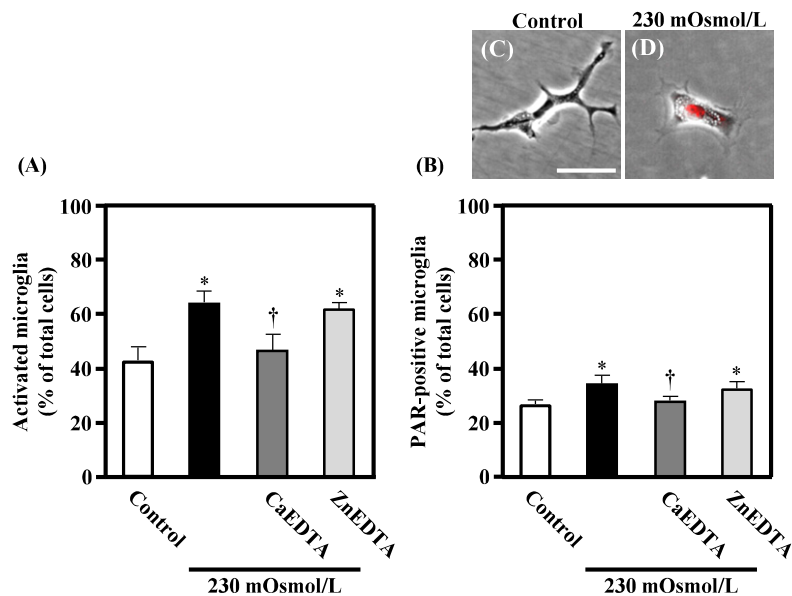


Fig. 4. Effect of Hypoosmotic Stress-loaded ACM on Microglial Activation

After astrocytes had been exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L) or hypoosmotic (230 mOsmol/L) BSS for 6 hr, supernatants were obtained as ACM. After ACM with or without 20 μ M CaEDTA or ZnEDTA was added to microglial cultures, and the cells were incubated for 2 hr. Thereafter, the morphological change (A) and PAR accumulation (B) in microglial cultures were evaluated by visual inspection with photomicrographs and by immunostaining with PAR formation, respectively. The panel B and C show representative merged phase-contrast images of microglial morphology and PAR immunofluorescence being indicated by red signals. We judged resting microglia with multiple branched processes (C), and activated microglia with retracted processes and a rounded, “amoeboid” morphology (D). Scale bar = 50 μ m. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the 230 mOsmol/L group. This figure was cited from Fig. 3 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

4. 低浸透圧ストレス負荷によるアストロサイト細胞内外亜鉛レベル増加に対する細胞内亜鉛キレート剤の影響

低浸透圧処理によるアストロサイト細胞内及び細胞外における亜鉛レベルの増加機構について検討した。細胞内亜鉛キレート剤である TPEN (Hedberg *et al.*, 1994) を 10-50 μM の濃度にて前処理したアストロサイトに対して低浸透圧処理した場合、細胞内 NG シグナルは TPEN 未処理群と比較して顕著に減弱したが、それはコントロール群の場合と比較して約 2 倍の高値であった (Fig. 5A)。この時のアストロサイト細胞外亜鉛レベルを測定したところ、いずれの濃度の TPEN 処理群においてもその未処理群と同程度であった (Fig. 5B)。これらの結果から、低浸透圧処理によるアストロサイト細胞内における亜鉛レベルの上昇は、一部 TPEN によりキレートされる遊離型のそれによること、並びにこのような細胞内亜鉛レベルの上昇は、細胞外亜鉛レベルの増加に関与しないことが示唆された。

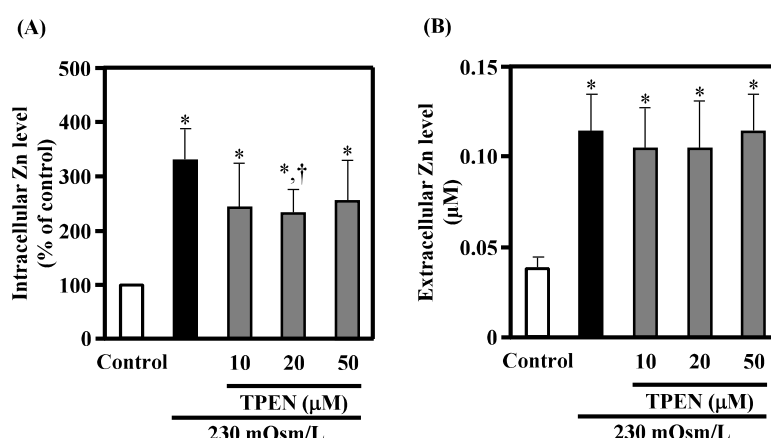


Fig. 5. Effect of TPEN on Hypoosmotic Stress-induced Alteration of the Intra- and Extracellular Zinc Levels in Astrocytes

After astrocytes had been incubated with 5 μM NG in the presence or absence of 10, 20 or 50 μM TPEN for 30 min, followed by washout, they were exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L) or hypoosmotic (230 mOsmol/L) BSS for 6 hr. Thereafter, the intra- (A) and extracellular (B) zinc levels were determined. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the 230 mOsmol/L group. This figure was cited from Fig. 4 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

5. 低浸透圧ストレス負荷によるアストロサイト細胞内亜鉛レベル増加に対する NOS 阻害剤及び細胞外亜鉛キレート剤の影響

Kruczek ら (2009) は、低浸透圧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レベルの増加が一酸化窒素 (NO) 依存的であることを報告している。そこで、低浸透圧処理によるアストロサイト細胞内遊離型亜鉛レベル増加へのその関与の有無について、非特異的 NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤である L-NAME を用いて検討した (Fig. 6)。低浸透圧処理によって増加したアストロサイト細胞内遊離型亜鉛レベルは、1 mM L-NAME の前処理群において有意に低下したものの、コントロール群のそれより高かった (Fig. 6A)。

また、細胞内遊離型亜鉛レベルの上昇は低浸透圧ストレス負荷により、細胞外に放出された亜鉛が細胞内に取り込まれることに起因する可能性が考えられる。そこで、細胞外亜鉛キレート剤である CaEDTA を用いて検討した。その結果、CaEDTA の添加は低浸透圧処理によって増加した細胞内 NG シグナル強度に対して何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 6B)。これらのことから、低浸透圧処理したアストロサイト細胞内の亜鉛レベルの増加は、少なくとも一部細胞内において産生された活性窒素種 (RNS) によって刺激されたメタロチオネインなどの金属タンパク質からの遊離に起因したものであり (Moro *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 1998; St Croix *et al.*, 2002; Uetsuka *et al.*, 2002)、細胞外へ放出された亜鉛が再び細胞内へ取り込まれたことによるものではないことが示された。

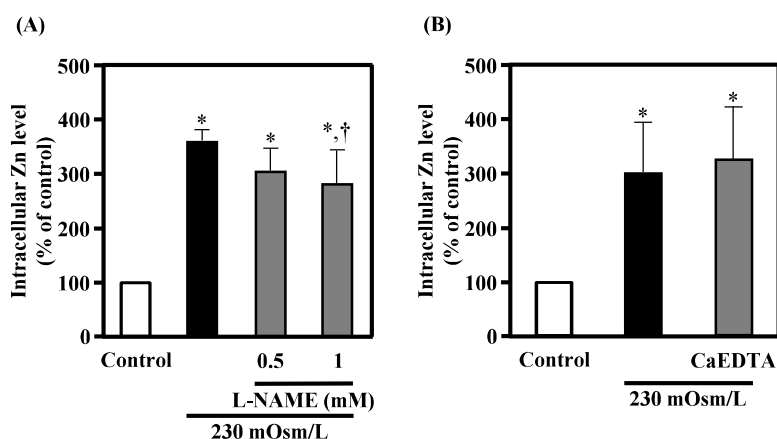


Fig. 6. Effects of L-NAME and CaEDTA on Hypoosmotic Stress-induced Alteration of the Intracellular Zinc Levels in Astrocytes

(A, B) After astrocytes had been incubated with 5 μ M NG in the presence or absence of 0.5 or 1 mM L-NAME for 30 min, followed by washout, they were exposed to normoosmotic (314 mOsm/L) or hypoosmotic (230 mOsm/L) BSS in the presence or absence of 20 μ M CaEDTA for 6 hr. Thereafter, the intracellular zinc levels were determined. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the 230 mOsm/L group. This figure was cited from Fig. 5 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

6. 低浸透圧ストレス負荷したアストロサイト細胞外における亜鉛レベル増加に対するエキソサイトーシス及び hemichannel 阻害剤の影響

アストロサイトの低浸透圧処理による細胞外亜鉛レベル増加へのエキソサイトーシス及び hemichannel の関与について検討した (Fig. 7)。低浸透圧処理したアストロサイト培養系における細胞外亜鉛レベルの増加は、エキソサイトーシス阻害剤である brefeldin A (BFA) (Fujiwara *et al.*, 1988) 及び非特異的 hemichannel 阻害剤である carbenoxolone (CBX) (Kamermans *et al.*, 2001) を前処理することにより、有意に低下した。このことより、低浸透圧処理によるアストロサイトからの亜鉛の放出は、少なくとも一部エキソサイトーシス及び hemichannel を介したものであることが示唆された。

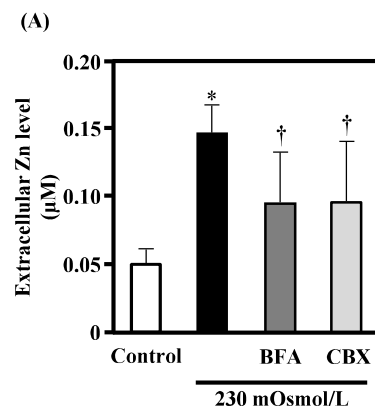


Fig. 7. Effect of BFA or CBX on Hypoosmotic Stress-induced Alteration of Extracellular Zinc Levels in Astrocytes

After astrocytes had been preincubated in BSS for 10 min, the cells were incubated with or without BFA (2.5 $\mu\text{g/mL}$) or CBX (100 μM) for 2 hr or 30 min, respectively. Then, they were exposed to BSS (314 mOsmol/L) or hypoosmotic BSS (230 mOsmol/L) for 6 hr. Thereafter, extracellular zinc levels were evaluated. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 5). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the 230 mOsmol/L group.

7. 低浸透圧ストレス負荷したアストロサイトにおける ZnT-1 の発現

近年、細胞質内から細胞外及び細胞内小器官への遊離型亜鉛の輸送に ZnT ファミリーが重要な役割を果たすことが指摘されている (Kirschke and Huang, 2008)。特に ZnT-1 は、細胞膜上に発現し、細胞内の亜鉛を細胞外へ輸送するトランスポーターであり (Lichten and Cousins, 2009)、低浸透圧ストレス負荷したアストロサイトにおける細胞外亜鉛レベルの増加に ZnT-1 が関与する可能性が考えられる。そこで、ZnT-1 の発現量を real-time PCR 法にて解析したところ、低浸透圧処理によってアストロサイトにおける ZnT-1 の mRNA 発現量は増加した (Fig. 8)。これらのことから、低浸透圧ストレス負荷アストロサイトにおける細胞外への亜鉛の輸送に ZnT-1 が関与する可能性が示された。

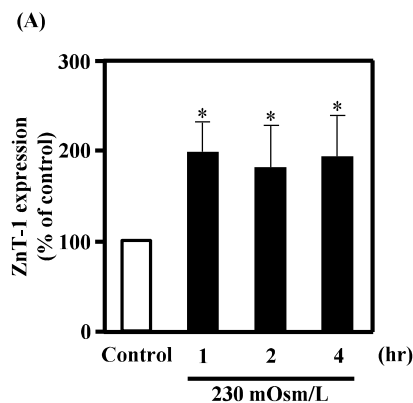


Fig. 8. Increased Expression of mRNA for ZnT-1 in Hypoosmotic Stress-loaded Astrocytes

After astrocytes had been preincubated in BSS for 10 min, they were exposed to normoosmotic (314 mOsmol/L, opened) or hypoosmotic (230 mOsmol/L, closed) BSS for the indicated times. Thereafter, mRNA expression of ZnT-1 was evaluated by real-time quantitative PCR. The amount of mRNA was normalized to the amount of mRNA for β -actin. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the control group. This figure was cited from Fig. 6 in *Life Sci.*, **94**, 134, 2014.

考 察

本章では、脳神経系細胞外の亜鉛供給源としてアストロサイトに着目し、アストロサイトがストレス負荷時に細胞外に亜鉛を放出し、それがミクログリアの活性化に関与するか否かを明らかにすることを目的として検討し、以下の成績を得た。(1) アストロサイトにおいて、低浸透圧処理は細胞外への亜鉛放出を引き起こし、それはミクログリアを活性化するグリオ伝達物質として機能することが明らかとなった。また、(2) 低浸透圧処理アストロサイトにおける細胞内遊離型亜鉛レベルの増加はRNS産生に伴ったメタロチオネインからの遊離、そして、細胞外亜鉛レベルの増加はエキソサイトシス、hemichannel 及び ZnT-1 からの放出に少なくとも一部起因することが示された。

脳傷害時にシナプス前神経細胞から亜鉛が放出されること (Assaf and Chung, 1984; Frederickson *et al.*, 1989)、並びに細胞外に放出された亜鉛によりミクログリアの活性化が引き起こされることが報告されている (Kauppinen *et al.*, 2008)。Fig. 4 に示すごとく、低浸透圧処理することによりアストロサイト細胞外に亜鉛が放出され、それはミクログリアの活性化を引き起こしたことから、亜鉛は神経伝達物質としてのみならず、アストロサイトから放出されるグリオ伝達物質としてミクログリアの活性制御に寄与することが示された。今回、アストロサイトに対し低浸透圧ストレスを負荷した時の、ACM中の亜鉛濃度は、ミクログリア活性化の評価に用いた6時間において約70 nMであった。また、このACMをミクログリアに作用した後に、有意なミクログリアの活性化が認められたのは曝露2時間後であった。これまでに、実験培地に塩化亜鉛を添加することで行われたミクログリアの活性化実験では、亜鉛濃度が15 μ M以上で曝露時間が90分においてその活性化が認められている (Kauppinen *et al.*, 2008)。このような違いが生じた要因として、低浸透圧ストレス負荷されたアストロサイトから亜鉛と共に放出されることが確認されたATP (Fig. 2) やグルタミン酸などの他のグリオ伝達物質の影響が考えられる (Pangrsic *et al.*, 2007; Parpura *et al.*, 1994; Scemes and Giaume, 2006; Verkhratsky and Kirchhoff, 2007)。しかしながら、低浸透圧ストレスを負荷した後に得られたACMを細胞外亜鉛キレート剤CaEDTAで処理することにより、ミクログリアの活性化はほぼ完全に抑制されたことから、ATPなどの他のグリオ伝達物質はミクログリアの活性化に寄与するのではなく、ミクログリアの亜鉛に対する感受性を高める可能性が推察される。一方、亜鉛はP2受容体やグルタミン酸受容体の細胞外アミノ末端領域に結合することで、その活性を制御することが知られている (Huidobro-Toro *et al.*, 2008; Shen and Yang, 1998; Sirrieh *et al.*, 2013)。これらの受容体はミクログリアの活性制御に関与することから (Haynes *et al.*, 2006; Zhang and Zhu, 2011)、亜鉛が他のグリオ伝達物質に対するミクログリアの感受性を調節する可能性も考えられる。これについては、第2章で得られた結果を基に考察する。

本検討において、低浸透圧ストレス負荷アストロサイトにおける ATP 放出は、Liu らの報告 (2008) と同様に、処理 10 分後から認められたのに対して、亜鉛は処理 4 時間後から放出が確認された (Fig. 2A 及び 3B)。一方、Schliess ら (2004) は、アストロサイトにおいて低浸透圧ストレス負荷 2 時間から peroxynitrite による nitrotyrosine の蓄積が生じること、また Kruczek ら (2009) は、アストロサイト細胞内におけるメタロチオネインなどからの亜鉛の遊離が、NO 依存的であることを報告している。したがって、低浸透圧ストレス負荷の初期に ATP は放出されるのに対して、亜鉛の放出はその負荷の後期に増加すると考えられる。これらの違いは ATP と亜鉛がグリオ伝達物質として異なる役割を持つことを示唆している。

Kitamura ら (2006) は、脳虚血後初期 (15-30 分) に脳内の亜鉛濃度が上昇することを報告している。その一方で、脳内の亜鉛濃度は虚血再灌流 6-36 時間後まで NO 依存的に高くなること (Aguilar-Alonso *et al.*, 2008)、並びに、脳虚血再灌流 48-60 時間後に細胞外亜鉛キレート剤 CaEDTA を投与することによって神経細胞死が抑制されることが報告されている (Calderone *et al.*, 2004; Dirnagl *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2004)。さらに Hamby ら (2007) は、脳虚血再灌流 8 時間後に PARP 阻害剤を投与し、ミクログリアの活性化を抑制することで遅発性神経細胞死が抑制されることを明らかにしている。これらのことから、脳虚血後に神経細胞から過剰に放出された亜鉛によって活性化されたミクログリアが初期の神経細胞死を増悪し、さらに、このミクログリアの活性化により生じた酸化ストレスによってアストロサイトから亜鉛が放出され、それがミクログリアを活性化することにより遅発性の神経細胞死が惹起される可能性が考えられる。

生理的状态において細胞内の亜鉛の大部分はメタロチオネインなどの細胞内タンパク質に結合しており、その遊離型レベルは極めて低いとされている (Cuajungco *et al.*, 1997)。メタロチオネインなどの金属結合タンパク質は、ROS や RNS と反応することで亜鉛を遊離する (Moro *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 1998; St Croix *et al.*, 2002; Uetsuka *et al.*, 2002)。また、アストロサイトに発現するメタロチオネインは、低浸透圧処理によりその発現量が増加することが報告されている (Chung *et al.*, 2008; Kruczek *et al.*, 2009)。今回、アストロサイトを低浸透圧処理することにより増加した細胞内遊離型亜鉛レベルは、NOS を阻害することにより部分的に抑制されたことから、アストロサイト細胞内における遊離型亜鉛レベルの増加は、少なくとも一部メタロチオネインからの遊離に起因すると考えられるが (Fig. 6)、他の機構の存在も考えられる。Huang ら (2005) は、亜鉛トランスポーターである Zrt- and Irt-like proteins (ZIP) ファミリーのアイソフォームの 1 つである ZIP7 がゴルジ体に発現しており、それはゴルジ体から細胞質内への遊離型亜鉛の輸送を介して、細胞質内の亜鉛の恒常性に関与することを報告した。このことから、今回著者が認めた低浸透圧ストレス負荷による細胞内遊離型亜鉛レベルの上昇は一部、

ゴルジ体などの細胞内小器官に由来する可能性が示唆される。一方、アストロサイトに対して酸化ストレスを負荷するとメタロチオネインから亜鉛が遊離することで細胞内遊離型亜鉛レベルが上昇し、細胞死が惹起されること (Lee *et al.*, 2014)、また、低浸透圧ストレスに起因したアストロサイトにおける細胞内遊離型亜鉛レベルの上昇は metal-regulatory transcription factor-1 (MTF-1) を介してメタロチオネインの発現を誘導することが報告されている (Kruczek *et al.*, 2009)。これらのことと、今回得られた知見を考え併せると、ストレス負荷の程度に依存してアストロサイトの細胞内遊離型亜鉛レベルの上昇の程度が変化し、それによってアストロサイトの応答が異なることが示唆される。これについては現在、著者の研究室において詳細な検討が進められている。

細胞内亜鉛キレート剤 TPEN は、低浸透圧処理により上昇したアストロサイト細胞内遊離型亜鉛レベルに影響しなかった (Fig. 5B)。Yamasaki ら (2007) は、肥満細胞の免疫的刺激が NG シグナルの顕著な増加を引き起こすが、それは 10 μ M の TPEN によって約 50%程度しか低下しないことを示している。TPEN の亜鉛に対する親和性 ($K_d=2.6\times 10^{-16}$ M) は NG のそれ ($K_d=1\times 10^{-6}$ M) よりも顕著に高いことから、これら亜鉛キレート剤の亜鉛に対する親和性の差は、TPEN の細胞内遊離型亜鉛レベルの増加に対する抑制が部分的であったことを説明できない。Kruczek ら (2009) は、低浸透圧処理により核やミトコンドリア内で NG シグナルが上昇することを報告している。これらのことから、核やミトコンドリアなどの細胞内画分に TPEN が透過できないために、低浸透圧処理による細胞内遊離型亜鉛レベルの増加を示す NG シグナルの変化が完全に抑制されなかったことが推察される。またこのことは、低浸透圧処理による細胞外への亜鉛の放出が一部エキソサイトーシスによるものであるという著者の結果を支持するものと考えられるが、詳細については現時点において不明である。

これまでに低浸透圧処理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機構として、ストレス負荷によって細胞外にグルタミン酸が放出され、それがオートクリン／パラクリン的にアストロサイトに発現する NMDA 型グルタミン酸受容体を活性化することで、細胞内カルシウムレベルが上昇し、それによって NOS が活性化することで細胞内遊離型亜鉛濃度が上昇することが示されている (Görg *et al.*, 2010; Kruczek *et al.*, 2009; Scließ *et al.*, 2004)。アストロサイトからのグルタミン酸の放出経路としては、エキソサイトーシス及び hemichannel のいずれともが関与するとの報告があることから (Görg *et al.*, 2010; Montana *et al.*, 2014; Montero and Orellana, 2015)、今回認められた低浸透圧ストレス負荷による細胞外への亜鉛の放出が CBX 及び BFA によって抑制されたことは、亜鉛自体のエキソサイトーシスや hemichannel を介しての放出に加えて、アストロサイトからのグルタミン酸の放出が減少したことに起因する可能性が考えられる。その一方で、アストロサイトにおいて ZnT-1 は恒常的に発現しており、細胞内遊離型亜鉛濃度の上昇による毒性に対して細胞保護的に働くことが報告

されている (Nolte *et al.*, 2004)。このことと、CBX 及び BFA による細胞外への亜鉛放出が部分的な抑制であったことを考え併せると、亜鉛放出の経路として ZnT-1 が一部関与すると考えられる。Fig. 8 に示すごとく、低浸透圧処理したアストロサイトにおいて ZnT-1 の mRNA 発現量の増加が認められたが、転写及び翻訳の時間を考慮すると、低浸透圧処理により誘導された ZnT-1 が本実験系において亜鉛放出に関与する可能性は低いと考えられる。しかしながら、脳虚血再灌流 6 時間後から長時間にわたり脳内の亜鉛濃度が上昇していることから (Aguilar-Alonso *et al.*, 2008)、*in vivo* において ZnT-1 が細胞外への亜鉛放出に重要な役割を果たすことが示唆される。最近、細胞内の遊離型亜鉛濃度が上昇するとリソソーム内に亜鉛が貯留し、エキソサイトーシスを介して細胞外に亜鉛が放出される機構の存在が報告された (Kukic *et al.*, 2014)。アストロサイトにおいてこの機構が存在するか不明であるが、これらの細胞内亜鉛動態制御機構は細胞内の遊離型亜鉛濃度の変化の程度に依存して機能する可能性が示唆されるため、今後より詳細な検討が望まれる。

以上のことから、低浸透圧処理によりアストロサイトの細胞内及び細胞外における亜鉛レベルが上昇し、それらはそれぞれ RNS 依存的なメタロチオネインからの遊離及びエキソサイトーシスや hemichannel 並びに ZnT-1 からの放出に少なくとも一部起因することが示された。さらにこの細胞外に放出された亜鉛はミクログリアを活性化することが明らかとなった。したがって、アストロサイトから放出された亜鉛は、ミクログリアの活性を制御するグリオ伝達物質として機能することで、グリア細胞間における機能連関に関与することが示された。

第2章 亜鉛誘発性ミクログリア活性化機構

緒言

第1章において著者は、亜鉛が神経伝達物質としてのみならず、アストロサイトから放出されるグリオ伝達物質としてミクログリアの活性制御に寄与することを見出した。この知見は、亜鉛がミクログリアの活性化因子であることを明らかにした Kauppinen ら (2008) において明確でなかったその供給源の一つがアストロサイトであることを示すものである。ミクログリアの活性化には、ATP や UDP などのヌクレオチドをリガンドとする P2 受容体が重要な役割を果たすことは周知の事実であり (Färber and Kettenmann, 2006; Inoue *et al.*, 2007; Inoue, 2008)、これは亜鉛がその活性化因子であるとする Kauppinen ら (2008) 及び著者の成績と異なるものである。

P2 受容体には G-タンパク質共役型の P2Y 受容体ファミリーとイオンチャネル型の P2X 受容体ファミリーが存在し、それぞれのサブタイプはミクログリアの活性化に伴う走化性や貪食能の誘導や interleukin-1 β (IL-1 β) の放出を介した炎症反応に関与することが示されている (Haynes *et al.*, 2006; Inoue, 2006; Koizumi *et al.*, 2007; Ohsawa *et al.*, 2007)。また、脳虚血後の活性化ミクログリアにおいて、P2 受容体の発現が増加すること (Kim *et al.*, 2006; Melani *et al.*, 2006)、さらに、ミクログリアはグルタミン酸や lipopolysaccharide (LPS) などによる様々な刺激を受けることにより、細胞外へ ATP を放出することが報告されている (Fujita *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2004)。ミクログリアの LPS による活性化には NLRP3 インフラマソームが関与しており、その上流には P2X7 受容体が存在する (Hanamsagar *et al.*, 2011; Mingam *et al.*, 2008)。さらに、P2X7 受容体はその活性化により ATP を細胞外に放出することが報告されている (Ma *et al.*, 2014)。したがって、ミクログリアの活性化において、P2 受容体の上流にそれを活性化する機構の存在が考えられる。

そこで、本章では亜鉛がヌクレオチド-P2 受容体を介した既知のミクログリア活性制御に関与するか否かを明らかにすることを目的に、亜鉛によるミクログリア活性化機構を精査した。

実験材料及び方法

1. 試薬

ZnCl₂, propidium iodide (PI), TPEN, dihydroethidium (DHE) は和光純薬工業から、acetovanillone (apocynin), 2'(3')-O-(4-benzoyl-benzoyl) ATP (BzATP), pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid)tetrasodium salt hydrate (PPADS), reactive blue 2 (RB2), brilliant blue G (BBG), oxidized ATP (oxATP), CBX, glybenclamide (GC), 6-N,N-diethyl-D-β-γ-dibromomethylene adenosine triphosphate (ARL 67156) は Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は、第 1 章実験材料並びに方法 1 項におけるものと同じものを用い、いずれも特級若しくは、それ以上の規格のものとした。

2. 細胞培養

マウス大脳皮質ミクログリアの初代培養は、第 1 章実験材料及び方法 2 項と同様に行った。

3. Reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)

培養ミクログリアの total RNA の抽出・精製及びその cDNA への逆転写は、第 1 章実験材料並びに方法 8 項と同様の方法で行った。P2 受容体アイソフォーム及び hemichannel アイソフォームの発現を調べるための PCR の条件及び使用したプライマーの配列は、それぞれ Table 3, 4 及び 5 に示す。PCR 産物は 2% アガロースゲル (和光純薬工業) を用いて電気泳動した。

Table 3. PCR Conditions for Detection of mRNAs of P2 Receptor Isoforms and Hemichannel Isoforms

Temperature	Time	
94°C	5 min	
94°C	30 sec	} 33 cycle
60°C	1 min	
72°C	15 sec	
72°C	10 min	

Table 4. Primer Sets for RT-PCR Amplification of P2 Receptor Isoforms

Isoform	Accession number	Primer sequences		Product size
P2X1	NM_008771	Forward	5'-GGTCTACGTCATTGGGTGGGTGTTTGT-3'	306 bp
		Reverse	5'-CCTTGGGCTTTCCTTCTGCTTTTCCT-3'	
P2X2	NM_001164833	Forward	5'-TGTGGGACGTGGAGGAATAC-3'	362 bp
		Reverse	5'-CTTGGAAGAACTTGAACCTGG-3'	
P2X3	NM_145526	Forward	5'-AGGGCACTTCTGTCTTTGTCATC-3'	626 bp
		Reverse	5'-CTCGCTGCCATTCTCCATCTTGT-3'	
P2X4	NM_011026	Forward	5'-AGAGATTCCTGATAAGACCAGCATT-3'	750 bp
		Reverse	5'-GTCCCGGTAGTAGTATCTCTTCTTCA-3'	
P2X7	NM_011027	Forward	5'-TGAGCCCTGCACAGTGAACGAG-3'	240 bp
		Reverse	5'-TCCAGGAGTCAGGGGTGAG-3'	
P2Y1	NM_008772	Forward	5'-TTTTAGTGTTCATCATAGGCTTCC-3'	420 bp
		Reverse	5'-TTTTGTTTTTCCGAGTCCCAGTGC-3'	
P2Y2	NM_008773	Forward	5'-CCGTGTCCTATGGCGTGGTGT-3'	870 bp
		Reverse	5'-TAGGCTCCGTGGGTGGCTTGG-3'	
P2Y4	NM_020621	Forward	5'-TGCCCCACCCTCGTCTACTACTATG-3'	785 bp
		Reverse	5'-CGCCACCTGCTGATGCTTTCTTC-3'	
P2Y6	NM_18368	Forward	5'-CGGACCTGATGTATGCCTGTT-3'	773 bp
		Reverse	5'-GACTCTCTGCCTCTGCCACTT-3'	
P2Y10	NM_172435	Forward	5'-TTGCTCATATCCTGTCCTTA-3'	455 bp
		Reverse	5'-AGCAATTGGTGGGTGTTTCA-3'	
P2Y12	NM_027571	Forward	5'-CACCGTCCTGTTCTTTGCTGGGCTCAT-3'	899 bp
		Reverse	5'-CTTCTTGTCTTTCTTCTTGTGTTGTC-3'	
P2Y13	NM_028808	Forward	5'-ATTTCCGTCTGGTCCCTGATGTTCTTC-3'	258 bp
		Reverse	5'-CCGCTTGTGCCTGCTGTCCTTACTCCT-3'	
P2Y14	NM_001008497	Forward	5'-ACAACCTCCACCACCACAGACCCTCCAA-3'	597 bp
		Reverse	5'-GAAGAAACACGACCCAGAAGATACTCA-3'	

Table 5. Primer Sets for RT-PCR Amplification of Hemichannel Isoforms

Isoform	Accession number	Primer sequences		Product size
Connexin26	NM_008125	Forward	5'-TCTTCTTCCGGGTCATCTTTGA-3'	142 bp
		Reverse	5'-TCTGTGGGCTGGAAATGAA-3'	
Connexin30	XM_006518560	Forward	5'-TGGGTACTGAAATGTGGCATTG-3'	84 bp
		Reverse	5'-AGTGAACACCGTTTTCTCAGTTG-3'	
Connexin37	NM_008120	Forward	5'-TGCTGGTGGTAGGAGTCATCTC-3'	84 bp
		Reverse	5'-TTATCTCCCGGCTGACACA-3'	
Connexin40	NM_008121	Forward	5'-TCCTCCCCCTGACTTCAATC-3'	86 bp
		Reverse	5'-TCCGGGAGCCCATGTTATTAC-3'	
Connexin43	NM_010288	Forward	5'-TTACAGCGCAGAGCAAAATCG-3'	86 bp
		Reverse	5'-TGTCGTCAGGGAATCAAACG-3'	
Connexin45	NM_008122	Forward	5'-TACACTGAGCTGTCCAATGCTAAGA-3'	104 bp
		Reverse	5'-AGATCAGCCGGGAGGTGTTTC-3'	
Connexin46	NM_016975	Forward	5'-TCTACGCCACCCCTCATCTATC-3'	97 bp
		Reverse	5'-TGTCTCTCCTCAGCAGCTCTTC-3'	
Pannexin-1	NM_019482	Forward	5'-TCCTCATTGCAGGGCTGTTA-3'	90 bp
		Reverse	5'-AGAAGCCCCAGGTCCTCTAG-3'	

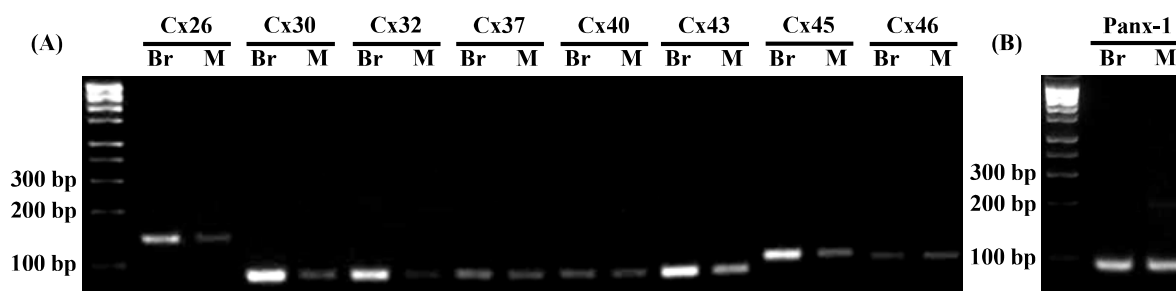


Fig. 9. Expression of mRNAs for Hemichannels in Mouse Microglia

cDNA obtained from mouse whole brain (Br) and mouse microglia (M) were subjected to PCR using a specific primer set for connexin (Cx) isoforms (A) and pannexin-1 (Panx-1) (B). Br was used as a positive control. PCR conditions and primer sequences were summarized in Tables 3 and 5.

4. 亜鉛によるミクログリア活性化の評価

4-1. 形態変化

ミクログリアの形態変化は、第1章実験材料及び方法7項と同様に行った。

4-2. PAR の蓄積

ミクログリアにおける PAR 蓄積は、第1章実験材料及び方法7項と同様に行った。

4-3. 細胞死の評価

細胞死の評価は PI を用いて行った。ミクログリアは亜鉛処理 90 分後に洗浄した後、FBS 不含 EMEM 中にて 24 時間インキュベーションした。そして、10 $\mu\text{g/mL}$ の PI を 15 分作用させた後、蛍光顕微鏡下にて観察及び Q-capture を用いて撮影した。得られた写真を用いて、全細胞数に対する PI の陽性細胞数を指標として死細胞率 (%) を算出した。

5. Superoxide anion の産生

Superoxide anion の検出は、その特異的プローブである DHE (Bindokas *et al.*, 1996) を用いた。ミクログリアは細胞培養液を除去し、EMEM に置換した後、まず 1 μM DHE を 30 分間作用させた。その後、亜鉛を添加した 90 分後に蛍光顕微鏡下にて観察及び Q-capture を用いて撮影し、superoxide anion と DHE との反応により生じた ethidium の赤色シグナルを指標として、superoxide anion の産生を評価した。

6. 細胞外 ATP 濃度の測定

ミクログリア細胞外 ATP 濃度の測定は、第1章実験材料及び方法4項と同様に行った。得られた ATP 濃度は細胞のタンパク質量にて補正した。

7. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準偏差 (S.D.) にて表示した。有意差検定は、Kauppinen ら (2008) の報告に基づき、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、2 群間比較の場合 Student's *t*-test を、多群間比較の場合は Tukey's test、対照群と処理群の対比較の場合は Dunnett'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. 細胞処理条件

初代培養されたミクログリアは、培養環境の違いによってその活性化状態が大きく異なる。既報 (Kauppinen *et al.*, 2008) では、ミクログリアを 30 μM の ZnCl_2 で 90 分間処理することでその活性化を誘発していたが、今回著者が実験を行う環境において、この条件ではミクログリアは活性化せず、細胞死も生じなかった。そこでミクログリアの活性化条件を検討した結果 (Fig. 10A-C)、60 μM 以上の ZnCl_2 処理において、その有意な活性化が惹起された。一方で、 ZnCl_2 処理ミクログリアにおける細胞生存率への影響を検討したところ、120 μM の ZnCl_2 処理によって PI 陽性細胞数が未処理群と比較して有意に増加した (Fig. 10D)。したがって、ミクログリアの活性化を惹起する条件として、60 μM ZnCl_2 処理を用いることとした。

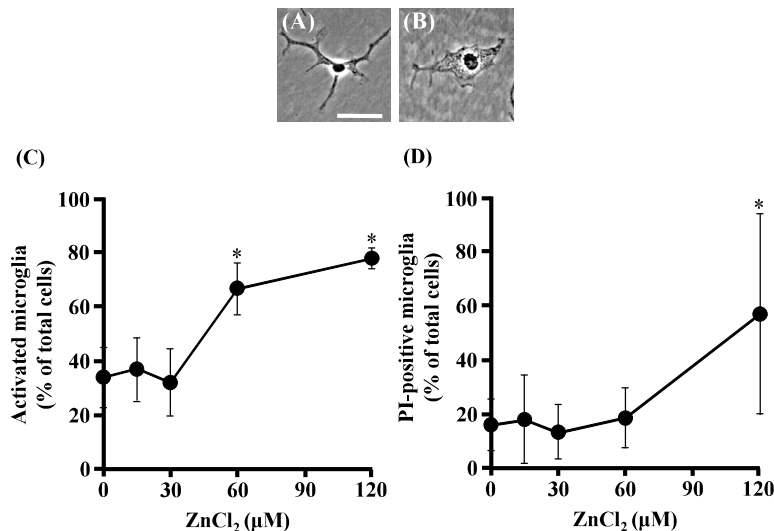


Fig. 10. Effect of Zinc Treatment on the Microglial Activation and Cell Death

Photomicrographs show representative morphology of resting microglia with multiple branched processes (A), and activated microglia with retracted processes and a rounded, "amoeboid" morphology (B). Scale bar = 50 μm . After microglia had been treated with the indicated concentrations of ZnCl_2 for 90 min, their morphological changes were evaluated by visual inspection with photomicrographs (C), and microglial survival was assessed by the PI exclusion method (D). Each point represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the 0 μM ZnCl_2 group.

2. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する細胞内亜鉛キレート剤の影響

亜鉛によるミクログリアの活性化機構において、ミクログリア細胞内に亜鉛が取り込まれることが必要であるか否かを明らかにするために、細胞内亜鉛キレート剤 TPEN の影響を調べた。その結果、TPEN の前処理により、亜鉛によるミクログリアの形態変化はほぼ完全に抑制された (Fig. 11A, B)。さらに、TPEN の前処理は、亜鉛によるミクログリアの PAR 蓄積及び superoxide anion の産生をいずれもほぼ完全に抑制した (Fig. 11C, D)。したがって、細胞外に添加された亜鉛が細胞内に流入することが引き金となり、ミクログリアが活性化されることが示された。

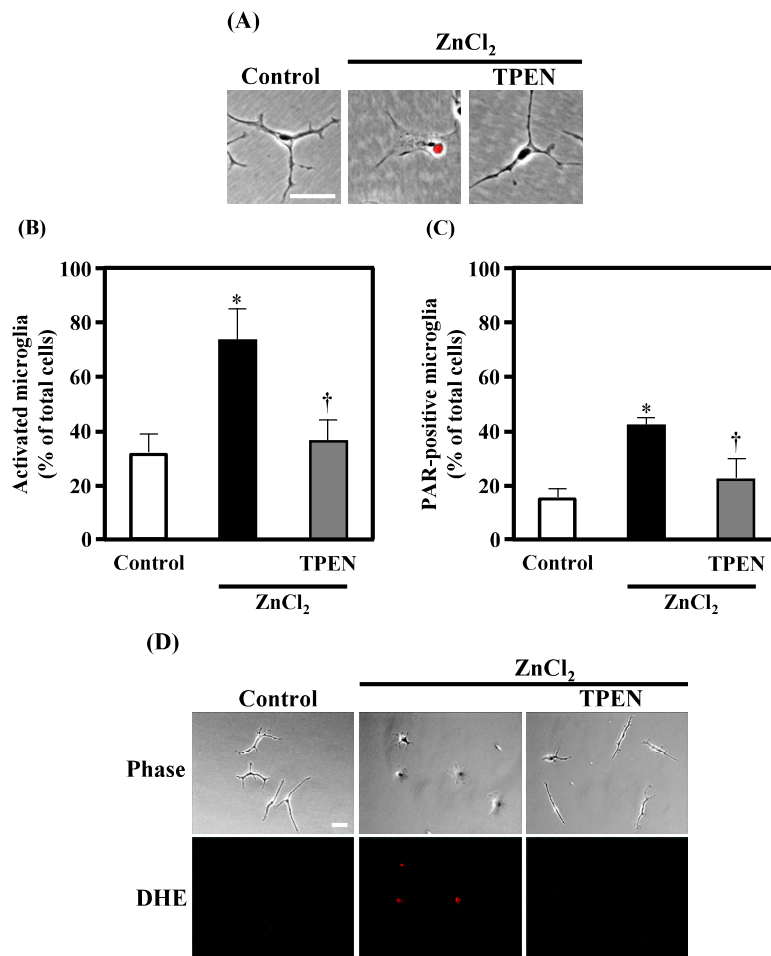


Fig. 11. Effect of an Intracellular Zinc Chelator on Zinc-induced Microglial Activation

Microglia were first treated with or without 25 μ M TPEN in the presence or absence of 1 μ M DHE for 30 min and then TPEN was removed by one washout with warmed EMEM prior to incubation with 60 μ M ZnCl₂ for 90 min. Panel A shows the representative photomicrographs merged phase-contrast images of microglial morphology with immunofluorescence for PAR (red signals). (B) Morphological changes were evaluated by visual inspection with photomicrographs. (C) PARP activation in microglia was assessed by immunostaining with PAR formation. (D) Superoxide formation in microglia was detected as red signals. Microglial morphology was shown in the corresponding phase contrast image. Each bar represent the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the ZnCl₂ group. Scale bar = 50 μ m. This figure was cited from Fig. 1 in *Glia*, 59, 1933, 2011.

3. ミクログリアにおける P2 受容体の mRNA 発現プロファイル

培養ミクログリアに発現する P2 受容体のサブタイプについて RT-PCR 法により検討した (Fig. 12)。その結果、ミクログリアには P2X_{1,4} 及び 7 受容体並びに P2Y_{1,2,6,12,13} 及び 14 受容体の mRNA の存在に基づく各増幅シグナルが検出された。

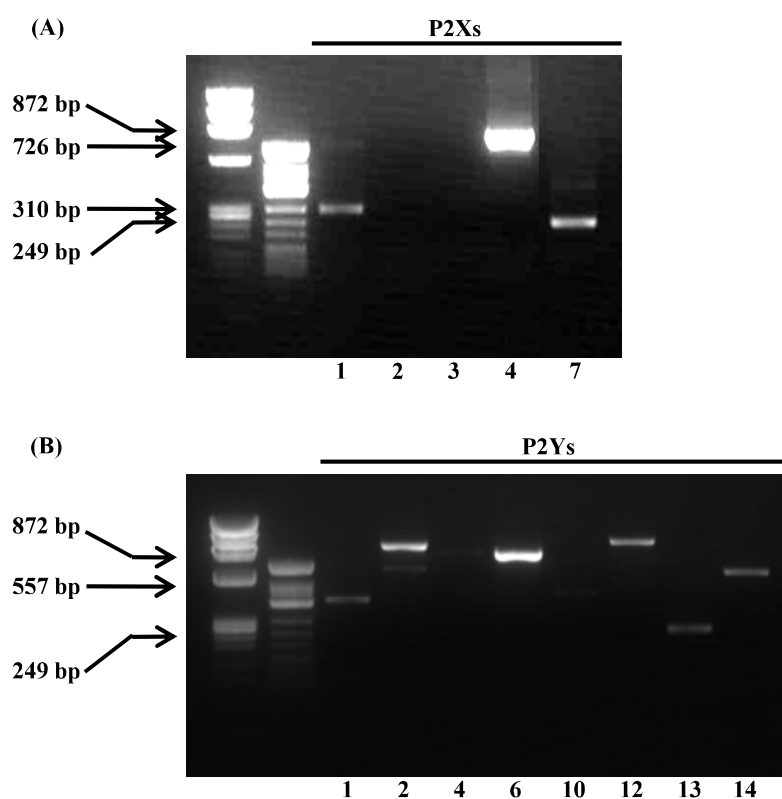


Fig. 12. Expression of mRNAs for P2 Receptors in Mouse Microglia

cDNA obtained from mouse microglia was subjected to PCR using a specific primer set for P2X (A) and P2Y (B) receptors. PCR conditions and primer sequences were summarized in Tables 3 and 4. This figure was cited from Fig. 6 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

4. 亜鉛による細胞外 ATP 放出への細胞内亜鉛キレート剤と CFTR 及び hemichannel 阻害剤の影響

ミクログリアに P2 受容体が発現していることが示されたことから、そのリガンドである ATP が亜鉛処理によりミクログリア細胞外へ放出されるか否かについて検討した。細胞外 ATP は細胞膜上に発現する NTPDases 等の ecto-nucleotidase により速やかに代謝されるため (Braun *et al.*, 1997)、その阻害剤 ARL 67156 併用下にて、細胞外 ATP 濃度を測定した。また、ATP の細胞外放出機構として、cystic transmembrane conductance regulator (CFTR) 及び pannexin-1、connexin 43 などの hemichannel が知られている (Ma *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2013)。そこで CFTR 阻害剤である glybenclamide (GC; Liu *et al.*, 2006) 及び pannexin-1 を含む非選択的 hemichannel 阻害剤である CBX (Bruzzone *et al.*, 2005) を用いてそれらの ATP 放出への影響も併せて検討した。その結果、ミクログリアに亜鉛を作用させることにより、細胞外 ATP 濃度が有意に上昇した。この亜鉛によって上昇した細胞外 ATP 濃度は GC の前処理では変化しなかったのに対し、CBX 前処理では細胞内亜鉛キレート剤 TPEN の場合と同様に、有意に低下した (Fig. 13)。したがって、亜鉛による細胞外への ATP の放出は、hemichannel を介することが示唆された。

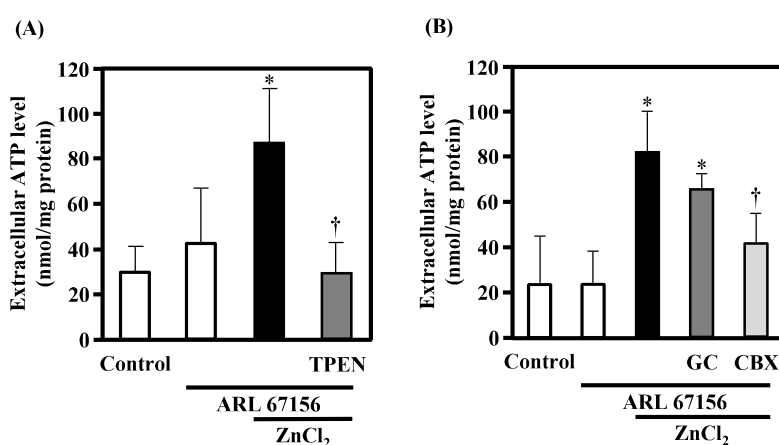


Fig. 13. Effect of an Intracellular Zinc Chelator, or Inhibitors for CFTR or Hemichannels on Zinc-induced ATP Release from Mouse Microglia

(A) After microglia had been preincubated with or without 100 μ M ARL 67156 for 30 min, followed by 30 min incubation with or without 25 μ M TPEN (A) or 100 μ M GC or 50 μ M CBX (B), they were treated with 60 μ M ZnCl₂ for 30 min. Thereafter, ATP concentrations from microglia was measured with a two-enzyme assay system. Each bar represent the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the ARL 67156 alone group. † $p < 0.05$, significantly different from the value of the ZnCl₂ + ARL 67156 group. This figure was cited from Fig. 5 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

5. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する CFTR 及び hemichannel 阻害剤の影響

亜鉛刺激によって細胞外に放出された ATP が、ミクログリアを活性化するか否かを検討した。Fig. 14 に示すように、亜鉛によって誘発されたミクログリアの形態変化、PAR 形成及び superoxide anion の産生は、細胞外 ATP 濃度変化の場合と同様に、GC 前処理では変化しなかったが、CBX の前処理によりほぼ完全に抑制された。これらの結果から、亜鉛刺激により hemichannel を介して細胞外へ放出された ATP は、NADPH oxidase による superoxide anion の産生とそれに続く PARP の活性化という既知の経路 (Kauppinen *et al.*, 2008) を介してミクログリアを活性化することが示された。このことは、Fig. 9 に示すように、ミクログリアには hemichannel として機能する主要な connexin 類及び pannexin-1 の発現が確認されたことから支持される。

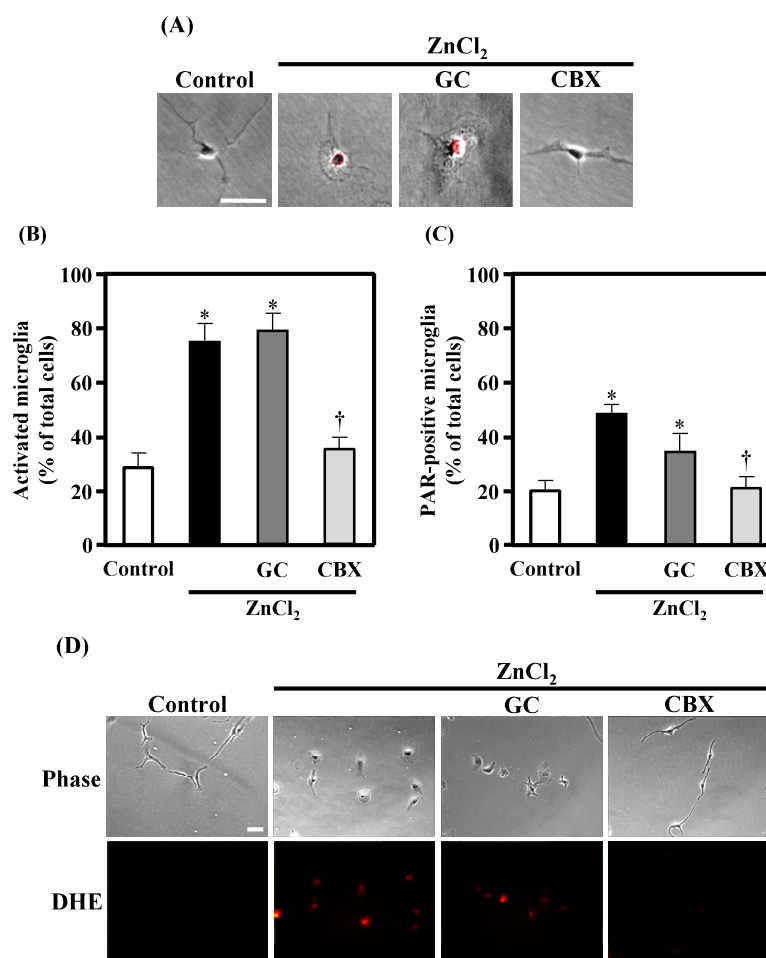


Fig. 14. Effect of CFTR or Hemichannel Inhibitors on Zinc-induced Microglial Activation

After microglia had been pretreated with or without 100 μ M GC or 50 μ M CBX in the presence or absence of 1 μ M DHE for 30 min, they were incubated with 60 μ M ZnCl₂ for 90 min. Panel A shows representative photomicrographs merged phase-contrast images of microglial morphology with immunofluorescence for PAR (red signals). (B) Morphological changes were evaluated by visual inspection with photomicrographs. (C) PARP activation in microglia was assessed by immunostaining with PAR formation. (D) Superoxide formation in microglia was detected as red signals, and their morphology was shown in the corresponding phase contrast image. Each bar represent the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.01$, significantly different from the value of the ZnCl₂ group. Scale bar = 50 μ m. This figure was cited from Fig. 5 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

6. 亜鉛によるミクログリアの活性化に対する P2 受容体アンタゴニストの影響

亜鉛によるミクログリアの活性化に關与する P2 受容体サブタイプを明確にするために、各 P2 受容体アンタゴニストのミクログリア活性化に対する影響を検討した (Fig. 15)。P2 受容体の非選択的アンタゴニストである RB2 及び BBG (Anderson and Nedergaard, 2006; Jiang *et al.*, 2000)、そして P2X4 以外の P2X 受容体に拮抗する PPADS (North, 2002)、並びに P2X7 受容体選択的アンタゴニストである oxATP の処理により (Murgia *et al.*, 1993)、亜鉛によるミクログリアの形態変化及び PAR 形成は有意に抑制された (Fig. 15A-C)。また、ミクログリアにおける P2 受容体アンタゴニスト処理は、NADPH oxidase 阻害剤 apocynin (Qin *et al.*, 2004) の場合と同様、亜鉛による superoxide anion の産生を抑制した (Fig. 15D)。したがって、亜鉛によるミクログリアの活性化には、P2 受容体、特に P2X7 受容体が關与することが示唆された。

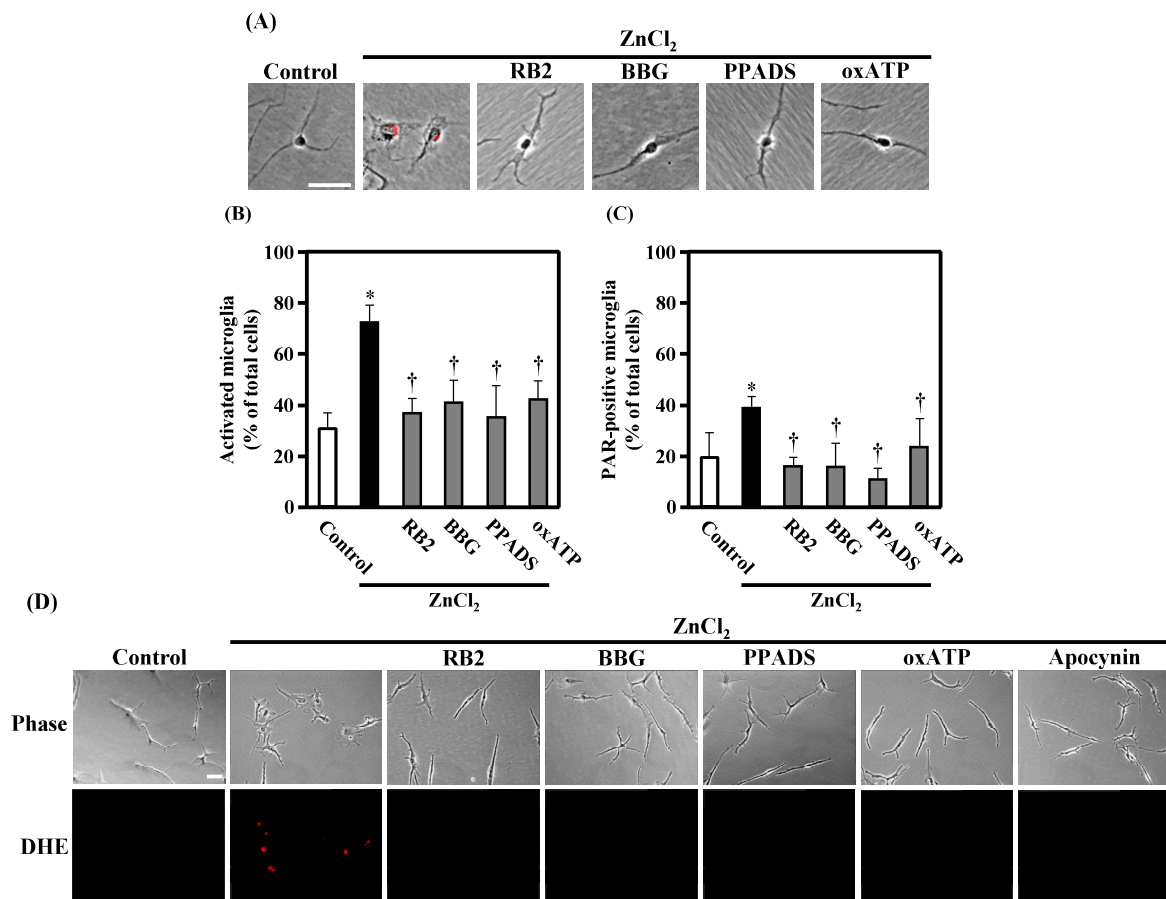


Fig. 15. Effect of P2 Receptor Antagonists on Zinc-induced Microglial Activation

After microglia had been preincubated with or without 10 μ M RB2, 1 μ M BBG, 100 μ M PPADS or 800 μ M apocynin in the presence or absence of 1 μ M DHE for 30 min, they were incubated with 60 μ M ZnCl₂ for 90 min. As for oxATP, cells were first treated with 100 μ M of it for 60 min and then oxATP was removed by one washout with warmed EMEM prior to incubation with 60 μ M ZnCl₂ or 1 μ M DHE. Panel A shows the representative photomicrographs merged phase-contrast images of microglial morphology with immunofluorescence for PAR (red signals). (B) Morphological changes were evaluated by visual inspection with photomicrographs. (C) PARP activation in microglia was assessed by immunostaining with PAR formation. (D) Superoxide formation in microglia was detected as red signals, and their morphology was shown in the corresponding phase contrast image. Each bar represent the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. † $p < 0.01$, significantly different from the value of the ZnCl₂ group. Scale bar = 50 μ m. This figure was cited from Fig. 6 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

7. P2X7 受容体アゴニストによるミクログリアの活性化における NADPH oxidase 及び PARP の影響

先に示した亜鉛誘発性ミクログリア活性化への P2X7 受容体の関与をより明確にするために、そのアゴニストによるミクログリアの活性化の有無を評価した。その結果、P2X7 受容体を選択的に活性化する 1000 μ M ATP 及び 100 μ M BzATP (Young *et al.*, 2006) は、多くのミクログリアの形態 “ameboid” 状に変化させ、PAR を蓄積するミクログリアの数を増加させた (Fig. 16A-C)。さらに DHE を用いて superoxide anion の産生を検討した結果、ATP 及び BzATP 処理により DHE のシグナルが増強し、NADPH oxidase 阻害剤である apocynin により superoxide anion の産生が抑制された (Fig. 16D)。以上の結果から、P2X7 受容体の活性化はミクログリアを活性化することが明らかとなった。

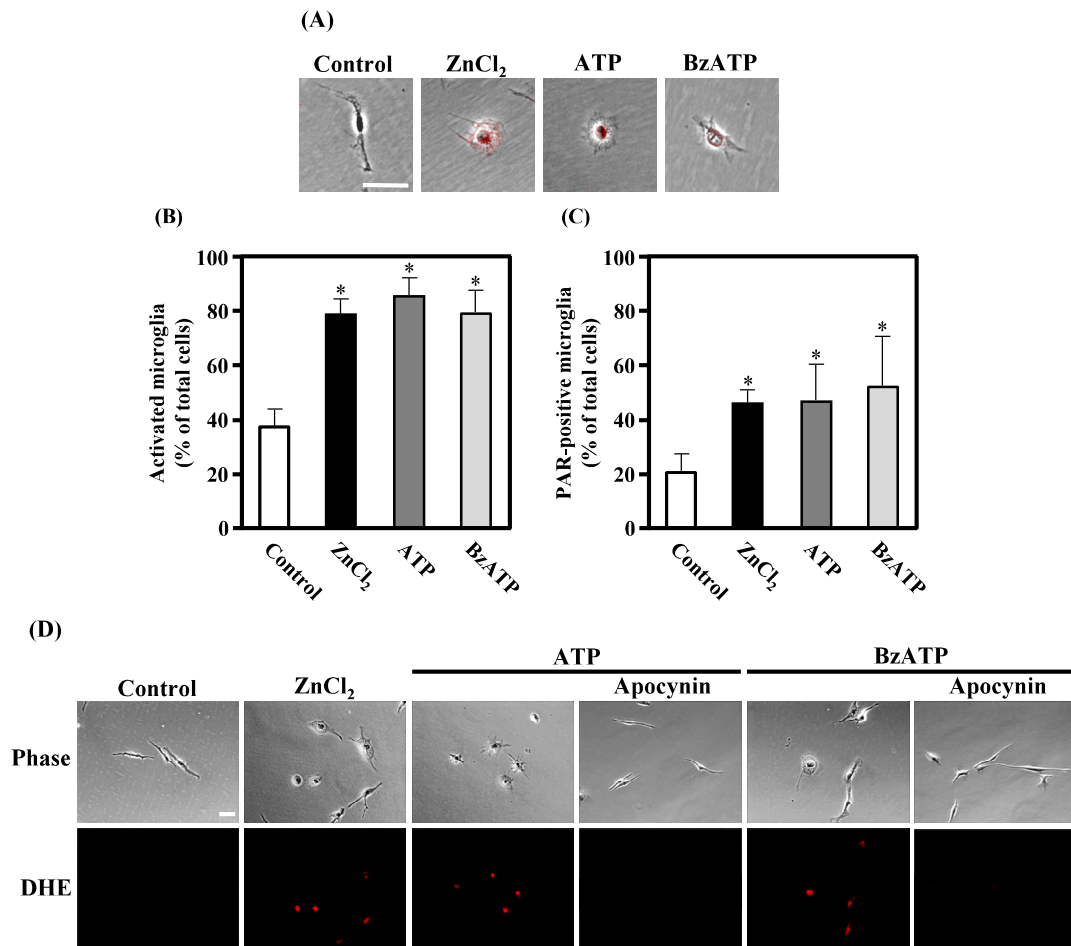


Fig. 16. Effect of ATP and BzATP on Microglial Activation.

After microglia had been preincubated with or without 800 μM apocynin in the presence or absence of 1 μM DHE for 30 min, they were incubated with 60 μM ZnCl_2 , 1000 μM ATP or 100 μM BzATP for 90 min. Panel A shows the representative photomicrographs merged phase-contrast images of microglial morphology with immunofluorescence for PAR (red signals). (B) Morphological changes were evaluated by visual inspection with photomicrographs. (C) PARP activation in microglia was assessed by immunostaining with PAR formation. (D) Superoxide formation in microglia was detected as red signals, and their morphology was shown in the corresponding phase contrast image. Each bar represent the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the value of the control group. Scale bar = 50 μm . This figure was cited from Fig. 7 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

考 察

本章では、亜鉛によるミクログリア活性化機構の解明を目的として、ヌクレオチド及び P2 受容体の関与について検討した。その結果、細胞外の亜鉛は、まずミクログリア細胞内に取り込まれ、それにより hemichannel を介して細胞外へ ATP が放出され、それがオートクリン／パラクリンのミクログリア自身に発現する P2X7 受容体を活性化することにより、ミクログリアの活性化が惹起されるといふ、ミクログリア活性化の新たなカスケードが明らかとなり、亜鉛が既知のヌクレオチド-P2 受容体を介したミクログリア活性化機構の上流に位置することが示された。

細胞外 ATP のシグナルは P2X4 受容体や P2Y12 受容体の活性化を介してミクログリアの走化性を誘導することが報告されている (Ohsawa *et al.*, 2007)。その一方で、破骨細胞や白血球では、亜鉛により走化性が誘導されることが報告されており (Hujanen *et al.*, 1995; Kanno *et al.*, 2001)、破骨細胞における走化性の誘導は G-タンパク質共役型受容体の活性化を介することが報告されている (Kanno *et al.*, 2001)。さらに、好中球においては、刺激物質が存在する方向に ATP が放出され、それが G-タンパク質共役型の P2Y2 受容体をオートクリン的に活性化することで遊走の方向付けがなされることが示されている (Chen *et al.*, 2006)。これらのことと今回の知見を考え併せると、ミクログリアにおいて、亜鉛及びその下流に位置する P2X7 受容体の活性化によって、特にその走化性が誘導される可能性が示唆された。

これまでミクログリアに発現する P2X7 受容体は、IL-1 β や tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性メディエーターの放出を介して炎症反応に関与すると考えられていた (Hide *et al.*, 2000; Sanz and Di Virgilio, 2000)。これに対し、P2X4 受容体はミクログリアの走化性を誘導する “find me” シグナルとしての ATP を受容するとされている (Ohsawa *et al.*, 2007)。これまで P2X7 受容体はホモ三量体として機能を発現し、ヘテロ複合体は形成しないとされてきた (Adinolfi *et al.*, 2010)。近年、ミクログリアにおいて P2X4 及び P2X7 受容体が共発現すること (Boumechache *et al.*, 2009)、そして P2X4 受容体は P2X2 受容体及び P2X7 受容体とホモ三量体を形成することで相互作用することが、それらの強制発現系を用いた研究により報告された (Antonio *et al.*, 2011)。さらに、P2X4 受容体は IL-1 α 及び iNOS、そして P2X7 受容体は IL-1 β 及び IL-6 の発現に関与すること (Smith *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013)、並びに P2X7 受容体の活性化がミクログリアの貪食能を抑制的に制御することが示されている (Ni *et al.*, 2013)。したがって、P2X7 受容体を含む P2X 受容体は、ミクログリアの走化性のみならず、炎症性サイトカインの発現の制御に寄与することから、脳虚血後の遅発性神経細胞死を抑制する治療戦略においてミクログリアの P2X7 受容体を含む P2X 受容体が非常に重要な標的になると示唆される。

第1章の考察において述べたように、亜鉛はATPなどのグリオ伝達物質に対するミクログリアの感受性を制御する可能性が考えられる。P2受容体は二価金属カチオンによってその活性が制御されることが明らかにされている (Huidobro-Toro *et al.*, 2008)。亜鉛はP2受容体のリガンドに対する感受性をサブタイプによって異なる制御を示すことが知られており、これは亜鉛がP2受容体の細胞外ドメインのヒスチジン残基などに結合することによるとされている (Acuña-Castillo *et al.*, 2007)。P2X7受容体に関して、亜鉛はラットP2X7受容体のATP感受性を減弱させるが (Virginio *et al.*, 1997)、マウスP2X7受容体に対して亜鉛はATPに対するその感受性を増大すると報告されている (Moore and Mackenzie, 2008)。これらの知見から、亜鉛は、その細胞内への流入に加えて、P2X7受容体のATP感受性を増大させることでミクログリアの活性化を惹起することが考えられる。

アストロサイトは、種々の刺激により、細胞外へATPを放出することが知られており、その放出に関与する分子としてP2X7受容体、maxi-anion channel、connexin/pannexinなどのhemichannel、エキソサイトーム及びCFTRが報告されている (Ballerini *et al.*, 2002; Coco *et al.*, 2003; Darby *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Stout *et al.*, 2002)。さらに、ミクログリアにおいて、ATPはconnexin 43及びpannexin-1などのhemichannel及びCFTRを介して放出されることが知られている (Liu *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2014; Orellana *et al.*, 2013)。今回、CFTRではなくhemichannelが亜鉛によるATPの細胞外放出に関与することが示唆された。また、ミクログリアにおけるhemichannelの発現を評価したところ、mRNAレベルにおいて、pannexin-1並びにconnexin 26, 30, 37, 40, 43, 45及び46が発現することが分かった (Fig. 9)。さらに、real-time PCR法によりそれらのmRNA発現量を検討したところ、特にpannexin-1とconnexin 43の発現量が多かったことから、これらの分子のATP放出への関与が推察されるが、今後、ATPの細胞外放出に関与する分子実体の解明が期待される。

脳虚血時に亜鉛やATPは、神経細胞から細胞間隙へ過剰に放出されるが (Pankratov *et al.*, 2006)、このATPは上述のごとくecto-nucleotidaseなどによる代謝を受けるため、その濃度上昇は緩徐であり (Kitamura *et al.*, 2006; Melani *et al.*, 2005)、また速やかに低下すると考えられる (Dunwiddie *et al.*, 1997)。一方、虚血後の脳内において、亜鉛濃度は急激に上昇することから (Kitamura *et al.*, 2006)、神経細胞から放出された亜鉛によるミクログリアの活性化は、脳障害後の初期の炎症反応の増悪に関与すると考えられる。また、亜鉛はミクログリアのiNOS及びNADPH oxidaseを活性化させることから (Kauppinen *et al.*, 2008)、亜鉛による活性化ミクログリアは脳虚血後のRNSやROSなどの酸化ストレスの主要な産生源であると考えられる。このことと第1章の検討結果を考え併せると、脳虚血後において、主に神経細胞に由来する亜鉛は、ミクログリアを活性化し、それに伴って産生された酸化ストレスによってアストロサイトから亜鉛が放出され、この亜鉛によってミクログリアの活性化が惹起さ

れることで、遅発性神経細胞死が引き起こされると考察される。したがって、本章において明らかとなった亜鉛によるミクログリアの活性化に関与する P2X7 受容体や hemichannel は、脳虚血後の遅発性神経細胞死を抑制する治療戦略においても非常に重要な標的であると考えられる。

第3章 アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛輸送特性の比較

緒 言

これまでに著者は、亜鉛が神経伝達物質としてのみならずグリオ伝達物質としても機能することを示した。ミクログリアの過剰な活性化は、神経細胞死を増悪させることから、脳内恒常性維持において、脳神経系における細胞外遊離型亜鉛動態の制御が極めて重要であることを示している。事実、生理的状态の脳内における細胞外遊離型亜鉛濃度は、nanomolar レベルに厳密に制御されていることが報告されている (Kitamura *et al.*, 2006; Sensi *et al.*, 1997)。

アストロサイトは神経／グリオ伝達物質の細胞外からのクリアランスの主役を担う脳神経系細胞である (Coulter and Eid, 2012; Schousboe *et al.*, 2004)。アストロサイトにおいて、細胞外の亜鉛はL型カルシウムチャネル、AMPA型グルタミン酸受容体及びエンドサイトーシスを介して取り込まれることが報告されている (Kresse *et al.*, 2005; Sensi *et al.*, 2006; Varea *et al.*, 2006)。一方近年、亜鉛に選択的なトランスポーターが数十種類存在することが明らかにされ (Eng *et al.*, 1998)、その中でも Zrt- and Irt-like proteins (ZIP) ファミリーは主に細胞外から細胞内への亜鉛の輸送に関与する主要なトランスポーターとされている (Gaither and Eide, 2001b)。Qian ら (2011) は、神経細胞における亜鉛の細胞内取り込みに ZIP1 及び ZIP3 が関与することを報告した。しかしながら、アストロサイトにおける ZIP ファミリーの機能的発現に関する情報は乏しいのが現状である。また、第2章において、亜鉛によるミクログリアの活性化において、細胞外から細胞内への亜鉛取り込みが必要であることが明らかとなったが、現時点においてそれを担う分子は不明である。

そこで本章では、アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛取り込み特性を精査し、それらを比較検討することで、脳内亜鉛クリアランスにおけるそれらの寄与について考察した。

実験材料及び方法

1. 試薬

^{65}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。 $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ (37 MBq/ml) は、American Radiolabeled Chemicals から購入した。 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , Ara-C, nifedipine, kainic acid n-hydrate, sucrose, chlorpromazine は和光純薬工業から、nimodipine は東京化成工業から、nystatin は Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は、第 1 章又は第 2 章実験材料及び方法 1 項におけるものと同じものを用い、いずれも特級若しくは、それ以上の規格のものとした。

2. 細胞培養

マウス大脳皮質アストロサイト及びミクログリアの初代培養は、第 1 章実験材料及び方法 2 項と同様に行った。不死化マウスミクログリア (MG6) 細胞 (理研バイオリソースセンター) 及び 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_2 気流下にて培養し、以下に示すように継代を行った。細胞を PBS で洗浄した後、0.05% trypsin-EDTA (GIBCOTM) 含有 PBS 溶液を添加し、細胞を剥離した。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 、3,000 rpm、5 分の条件で遠心分離した。回収した細胞は、適量の 10% FBS 含有 DMEM で懸濁し、生細胞数は trypan blue 色素排除試験により評価した (Jones and Senft, 1985)。得られた細胞は、生細胞として MG6 細胞では 5.0×10^4 cells/cm²、HEK293T 細胞では 1.0×10^5 cells/cm² の密度で polyethyleneimine (PEI; Sigma-Aldrich) コーティングした 24 well cell culture plate に播種し、それぞれ 3~4 日後及び 1~2 日後に実験に用いた。なお、DMEM は高圧蒸気滅菌 (121°C , 20 分) した後、L-glutamine、 NaHCO_3 及び非働化処理済 (56°C , 20 分) FBS を最終濃度がそれぞれ 0.584 g/L、0.06%及び 10%となるように加えた。

3. 取り込み実験

^{65}Zn 及び $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ 取り込み実験は、HEPES-HBSS (buffer A; 136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.3 mM Na_2HPO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.4 mM MgSO_4 , 25 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, pH 7.4) 又は Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free buffer A (buffer B) を取り込み実験用緩衝液として用いて行った。基質取り込み実験では、細胞を buffer A 又は B 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 (^{65}Zn : 1.5-15.0 kBq/well, $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$: 185 kBq/well) を添加することにより、反応を開始した。なお、阻害実験において各

阻害剤は基質と同時添加した。一定時間経過後、1 mM の ZnCl_2 を含む氷冷 buffer A を添加することにより反応を停止した。なお、これらの条件において、ミクログリアの活性化は認められないことを形態学的観察により確認した (Fig. 17)。その後、細胞に水を添加し、 -80°C に凍結して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 ^{65}Zn 濃度は、その溶液の放射活性をガンマカウンタ (1480 WIZARD³; PerkinElmer) を用いて測定することにより算出した。細胞内 $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ 量は測定用試料を clearsol (Nacalai tesque) と混和し、放射活性を液体シンチレーションカウンタにて測定した。取り込み値は各 well のタンパク質濃度で補正した。なお、今回実験で用いた ^{65}Zn (0.25-2.5 nM) のガンマ線による細胞毒性によって 60 分まで亜鉛取り込みが影響されないことを確認した (Fig. 18)。

細胞容積は、細胞内外の $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ 濃度が等しくなるまで細胞と $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ を一定時間反応させた後、タンパク質量 (mg) で除して推定した (Nagasawa *et al.*, 2006)。Table 6 に $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ 濃度から見積もったアストロサイト及びミクログリアの細胞容積を示す。

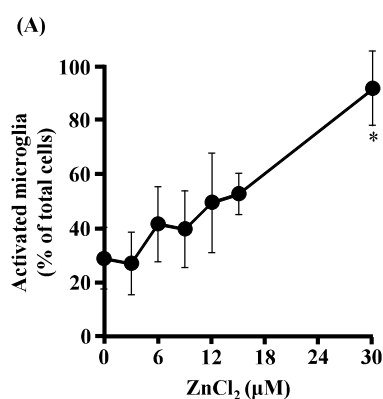


Fig. 17. Effect of Zinc Treatment on the Microglial Activation

After microglia were treated with the indicated concentrations of ZnCl_2 in buffer B for 90 min, their morphological changes were evaluated with a microscope. Each point represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the 0 μM ZnCl_2 group.

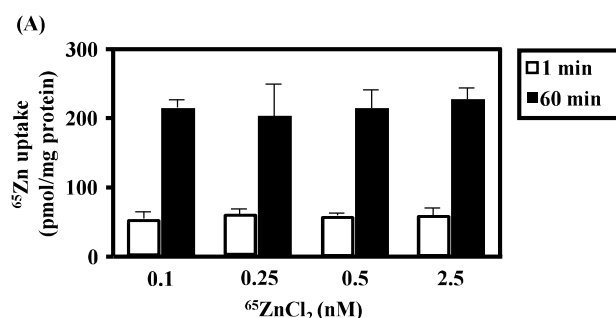


Fig. 18. Effect of Tracer Levels of ^{65}Zn on Its Uptake by Mouse Astrocytes

Astrocytes had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C , and then incubated with 50 nM ZnCl_2 (0.25-2.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 50 nM ZnCl_2) for 1 or 60 min at 37°C . The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptake was determined. Each figure represents the mean \pm S.D. (N = 3). This figure was cited from Fig. S1 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

Table 6. The [³H]Water Spaces of Astrocytes and Microglia

[³ H]water space (μL/mg protein)	
Astrocyte	Microglia
5.51 ± 1.18	7.88 ± 3.44

After astrocytes and microglia had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C, they were incubated with 185 kBq [³H]H₂O for 30 min at 37°C. The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular [³H]water levels were determined. Each value represents the mean ± S.D. (N = 3).

4. マウス ZIP1 (mZIP1) 過剰発現細胞

プラスミド DNA (pcDNA3.1/mZIP1 及び pcDNA3.1) は、QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて精製した。pcDNA3.1/mZIP1 は、ddY 系マウス大脳皮質ミクログリア由来の mZIP1 cDNA を pcDNA3.1 の EcoRV 及び XhoI 領域に挿入することにより得た。なお、mZIP1 cDNA の塩基配列は、既知のそれ (NM_013901) と一致することを確認した。遺伝子導入には、Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies™) を用いた。即ち、それぞれ必要量の pcDNA3.1/mZIP1 または pcDNA3.1 (いずれも 0.8 μg/cm²) を Opti-MEM® (50 μL/cm²; Life Technologies™) 及び Lipofectamine™ 2000 (1.0 μg/cm²) と混和し、DNA-liposome 複合体を形成させるために、室温にて 20 分間放置した。この溶液を播種後 24 時間経過した HEK293T 細胞に添加し、6 時間作用させた後、培地を 10% FBS 含有 DMEM に置き換えて、37°C、5% CO₂ 気流下で 48 時間培養して実験に用いた。なお、以降は pcDNA3.1/mZIP1 及び pcDNA3.1 を導入した HEK293T 細胞をそれぞれ mZIP1/HEK293T 細胞及び mock/HEK293T 細胞と表記した。

5. 免疫細胞染色

アストロサイト、ミクログリア、mZIP1/HEK293T 細胞及び mock/HEK293T 細胞は、まず氷冷した BSS で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA) 溶液で 4°C にて 20 分間固定した。その後、70% ethanol (-20°C)、90% ethanol (-20°C)、100% ethanol (-20°C) にてそれぞれ 3 分間処理することで脱水し、完全に風乾後、室温にて 30 分間 blocking を行った。Blocking buffer は 2% goat serum, 0.2% Triton X-100 及び 0.1% BSA 含有 PBS を用いた。その後、blocking buffer により調製した rabbit anti-ZIP1 antibody (1:250; #ZIP11-A; Alpha Diagnostic)、mouse anti-Cadherin antibody (1:100; #ab6528; Abcam) 及び rat anti-CD11b antibody (1:50; #MCA74GA; Serotec) を 4°C にて一晩反応させた。その後、PBS で洗浄し、2 μg/mL Hoechst 33258 及び 2% goat serum 添加 PBS 溶液で調製した Alexa Flour® 488 標識抗 rabbit IgG antibody (1:1000;

#A11008; Life Technologies™)、Alexa Flour® 546 標識抗 mouse IgG antibody (1:1000; #A11018; Life Technologies™) を遮光下、室温にて 60 分間反応させた。続いて PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META; Carl Zeiss) にて観察し、染色画像を得た。

6. RNA 干渉

ZIP1 のノックダウンは、アストロサイト及び MG6 細胞に small interfering RNA (siRNA) を導入することにより行った。mZIP1 mRNA の領域を標的とした 3 種類の siRNA の混合物 (siTrio™ Full Set) を B-Bridge International より購入した。実験に使用した siRNA の塩基配列は Table 7 に示す。siRNA の導入用試薬は、HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) を使用し、付属プロトコールに従い Opti-MEM® (100 µL/well; Life Technologies™) 中において siRNA (20 µM, 1.5 又は 15 µL/well) 及び HiPerFect Transfection Reagent (9 又は 18 µL/well) を混和した後、室温において 15 分間静置することで siRNA-HiPerFect 複合体を形成した。さらに、siRNA-HiPerFect 複合体を 24 well cell culture plate に添加した後、その上にアストロサイト及び MG6 細胞を、それぞれ 3.0×10^4 cells/cm² 及び 5.0×10^4 cells/cm² の密度で播種し、37°C、5% CO₂ 気流下にて 3 又は 6 時間反応した。その後、10% FBS 含有 EMEM 又は 10% FBS 含有 DMEM を添加して、さらに 48 時間培養した細胞を実験に使用した。

Table 7. Sense and Antisense Sequences of siRNAs for Mouse ZIP1

Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
caguagggcuggaagugaTT	uucacuuccagccuacugTT
gcacgauggaccaggaucTT	gaucccugguccaucgugcTT
cuguagggguugcagcgagaTT	ucucgcugcaaccuacagTT

7. Real-time PCR

ZIP アイソフォームの mRNA 発現量は、第 1 章実験材料及び方法 8 項と同様に行った。使用したプライマーの塩基配列は Table 8 に示す。

Table 8. Primer Sets for Real-time PCR Amplification of ZIP Isoforms

Isoform	Accession number	Primer sequences		Product size
ZIP1	NM_013901	Forward	5'-TTGGCTACATGTCTTCTGGACCTG-3'	177 bp
		Reverse	5'-TGGACTGGTCTGTTCTTGTAAAGC-3'	
ZIP2	NM_001039676	Forward	5'-TAAGGGAAATTCTTCTCGTGATGC-3'	159 bp
		Reverse	5'-TCCTCTTCCTGTACTGTTCGATCCTC-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'-AGAGATATTCCATGGCTGTGC-3'	
ZIP5	NM_001136237	Forward	5'-TCCAGTGGCCTCAGCACTA-3'	107 bp
		Reverse	5'-AGCAGCTTCCGAAAGGATAA-3'	
ZIP6	NM_139143	Forward	5'-ATGGCAACAGGGATATTCATCG-3'	132 bp
		Reverse	5'-ACTAGCATCATTGTGCAACATCTC-3'	
ZIP7	NM_001077709	Forward	5'-TGCTGCCTGAGCTATTGAGAGA-3'	92 bp
		Reverse	5'-AATCAGTACCATCATGGCAACAC-3'	
ZIP8	NM_001135149	Forward	5'-CCATAGCGATCCTGTGTGAGG-3'	115 bp
		Reverse	5'-AACACGCGGAGAGGAAGTTG-3'	
ZIP9	NM_026244	Forward	5'-TAAGAGCAGTAAAGAAGCCCTTTCA-3'	90 bp
		Reverse	5'-ACGGTGGCAACATAAAGAAATC-3'	
ZIP10	NM_172653	Forward	5'-TCAGTATGCCAACATCACA-3'	97 bp
		Reverse	5'-ATGATGGCGAATCCAAACAG-3'	
ZIP11	NM_027216	Forward	5'-ATCCTGGCCATCACCATACAC-3'	132 bp
		Reverse	5'-ATTCTGGATCCCAATTCCATG-3'	
ZIP12	NM_001012305	Forward	5'-AATGTGCCAGCCTCCAACA-3'	100 bp
		Reverse	5'-TTACTAGGCCATCTGCAAAAATTGTG-3'	
ZIP13	NM_026721	Forward	5'-TGCTTGCCAACACCATAGACAAC-3'	84 bp
		Reverse	5'-CAGAAGCCCGATCTTTTTCG-3'	
ZIP14	NM_00135151	Forward	5'-TCTGCCAGGAGGATGAGAAG-3'	187 bp
		Reverse	5'-ATAATGGAGAAGCCGGTTAGG-3'	

8. ウェスタンブロット

8-1. 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、11,700 xg で 5 分間の遠心分離により細胞を採取した。得られた細胞塊に適量の extraction buffer (4 mM HEPES, 1 mM DTT, 10 mM EGTA, 0.32 M sucrose, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DFP, 10 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL pepstatin, 5 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL benzamidin, pH 7.4) を加え、超音波処理により細胞を破碎し、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液と同量の Laemmli sample buffer (0.25 M Tris-HCl, 2% SDS, 30% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を加えた後、95°C、5 分間の熱変性を行った。

8-2. ウエスタンブロット

8-1 で得られたサンプルを 12.5% polyacrylamide gel に添加し、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を行った。その後、タンパク質を gel から polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon; Millipore) へ転写し、0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) にて洗浄後、0.05% NaN_3 添加 5% スキムミルク (Difco) 中にて 60 分間の blocking を行った。一次抗体には、Can Get Signal[®] Solution 1 (東洋紡) により調製した rabbit anti-ZIP1 antibody (1:100; #ZIP11-A; Alpha Diagnostic) 又は mouse anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) antibody (1:10,000; #016-25523; 和光純薬工業) を用い、blocking 処理した PDVF 膜と 4°C にて一晩作用させた。二次抗体は、5% スキムミルク含有 PBS-T により調製した 5% horse-radish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-rabbit IgG antibody (1:10,000; #PI-1000; Vector Laboratories) 又は goat anti-mouse IgG antibody (1:10,000; #PI-2000; Vector Laboratories) を室温にて 60 分間作用した。タンパク質の検出には Western Lightning[®]-ECL (Perkin Elmer) を使用し、感光は X 線フィルム (Fuji Film) を用いて行った。ZIP1 のタンパク質発現量の定量解析は、検出された ZIP1 のバンド強度を Image J software (ver. 1.48; National Institutes of Health) により測定し、GAPDH のバンド強度にて補正した。

9. 速度論的解析

速度論パラメータは、基質濃度依存性実験の結果を基に非線形最小二乗法プログラム MULTI (Yamaoka *et al.*, 1981) を用いて Eadie-Hofstee の式 (1) により算出した。

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

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} は最大初期取り込み速度をそれぞれ示す。

10. 統計学的処理

得られた実験値は、平均値±標準偏差 (S.D.) にて表示した。有意差検定は、Kauppinen ら (2008) の報告に基づき、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定し、2 群間比較の場合 Student's *t*-test を、多群間比較の場合は Tukey's test、対照群と処理群の対比較の場合は Dunnett'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}Zn 取り込み特性

アストロサイト及びミクログリアによる ^{65}Zn 取り込みの時間推移について検討した結果を Fig. 19A, B に示す。両細胞における ^{65}Zn の細胞内取り込みは、5 分まで直線的に増加し、その後定常状態に達した。この結果に基づき、以後の実験における ^{65}Zn の初期取り込み速度の評価は 1 又は 3 分にて行った。次に、基質濃度依存性について検討した結果、 ^{65}Zn の取り込みは基質濃度の増加に伴い上昇し、 $5\ \mu\text{M}$ 以上において飽和した (Fig. 19D, E)。この結果を Eadie-Hofstee 解析したところ、これらの取り込み速度とクリアランス (v/s) は、2 本の直線で近似された。このことから、アストロサイト及びミクログリアにおいて細胞外の亜鉛は少なくとも 2 つの特殊輸送系を介して細胞内に取り込まれることが示された。

両細胞の亜鉛取り込みに関する速度論パラメータを Table 9 に示す。アストロサイト及びミクログリアにおける高親和性コンポーネントの K_{m1} 値はそれぞれ 1.11 及び $1.40\ \mu\text{M}$ 、そして低親和性コンポーネントの K_{m2} 値は 7.02 及び $6.83\ \mu\text{M}$ であり、両細胞間でこれら K_m 値に差異はなかった。また、高親和性コンポーネントにおいてミクログリアの $V_{\max 1}$ 値及び取り込みクリアランス ($V_{\max 1}/K_{m1}$) 値はアストロサイトのそれら値よりも高かった。一方、低親和性コンポーネントにおける $V_{\max 2}$ 値及び $V_{\max 2}/K_{m2}$ 値は有意な差はなかったものの、ミクログリアの方が高い傾向にあった。これらの速度論的パラメータから、両細胞において亜鉛取り込みは類似の輸送システムを介するが、その取り込み効率はミクログリアの方が高いことが示唆された。

さらに、両細胞における亜鉛の細胞内濃縮率 (cell-to-medium concentration ratio (C/M 比)) 及び細胞容積で補正した V_{\max}/K_m (cV_{\max}/K_m) 値を算出した (Table 10)。アストロサイト及びミクログリアにおける cV_{\max}/K_m 値は、それぞれ 270 及び $945\ \mu\text{L}/\mu\text{L cell volume per min}$ であり、後者の方が高値であった。また、アストロサイトの初期取り込み相 (1 分) における C/M 比は 120 であるのに対して、ミクログリアにおけるそれは 324 と顕著に高かった。その一方で、定常状態 (60 分) におけるアストロサイト及びミクログリアの C/M 比は 1033 及び 1139 とほぼ同値であった。以上の結果より、ミクログリアの亜鉛取り込み効率はアストロサイトよりも高いが、定常状態における亜鉛取り込み能力は両細胞でほぼ同等であることが示された。

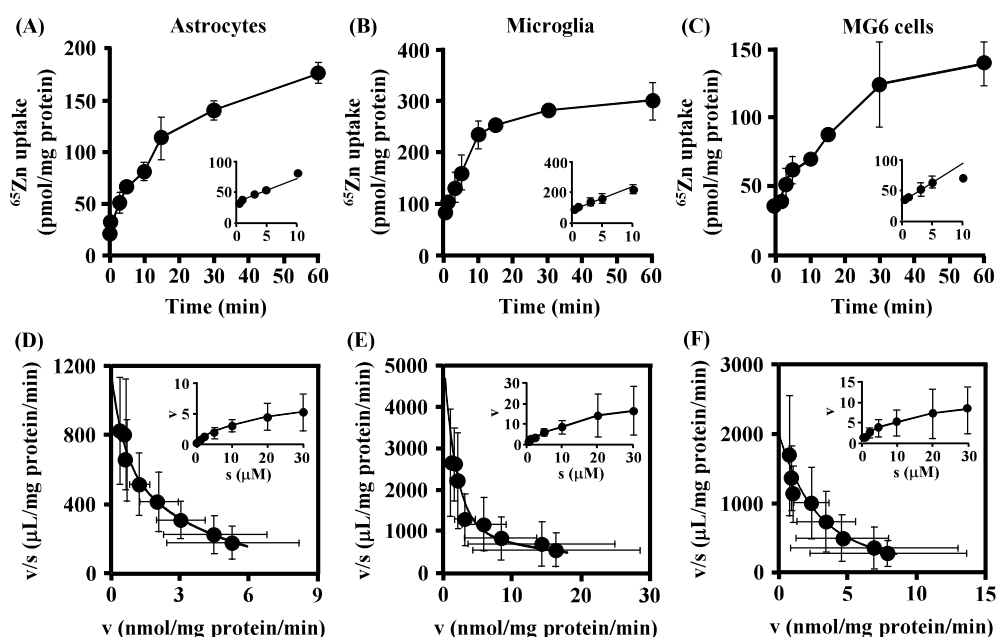


Fig. 19. Time- and Concentration-dependency of ^{65}Zn Uptake by Mouse Astrocytes, Microglia and MG6 Cells

After astrocytes, microglia and MG6 cells had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C , they were incubated with 50 nM ZnCl_2 (0.25 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 50 nM ZnCl_2) for the indicated times (A-C) or 0.5-30 μM ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 0.5-30 μM ZnCl_2) for 1 min (D-F) at 37°C . The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. The Eadie-Hofstee plots for the concentration-dependent ^{65}Zn uptake by mouse astrocytes, microglia and MG6 cells are shown in the panels D-F, and the insets in them show their concentration- ^{65}Zn uptake profiles in the cells. Each point represents the mean \pm S.D. (N = 3-4). This figure was cited from Fig. 2 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

Table 9. Apparent Kinetic Constants for ^{65}Zn Uptake by Astrocytes, Microglia and MG6 cells

		Astrocytes		Microglia		MG6 cells
		Control	+20 μM NiCl_2	Control	+20 μM NiCl_2	Control
High-affinity uptake system	K_m1 (μM)	1.11 ± 0.06	1.22 ± 0.45	1.40 ± 0.25	1.58 ± 0.19	1.39 ± 0.26
	$V_{\max}1$ (pmol/mg protein per min)	1155 ± 533	585 ± 294	$6575 \pm 2745^\dagger$	2849 ± 1491	2986 ± 693
	$V_{\max}1/K_m1$ ($\mu\text{L}/\text{mg}$ protein per min)	1035 ± 462	$472 \pm 100^\ddagger$	$4588 \pm 1389^\dagger$	$1885 \pm 1186^\ddagger$	$2212 \pm 675^\S$
Low-affinity uptake system	K_m2 (μM)	$7.02 \pm 5.07^*$	$15.16 \pm 1.99^\ddagger$	$6.83 \pm 0.88^*$	$16.31 \pm 6.41^\ddagger$	$8.54 \pm 2.82^*$
	$V_{\max}2$ (pmol/mg protein per min)	3708 ± 3528	919 ± 738	16575 ± 17740	7638 ± 6667	7942 ± 11920
	$V_{\max}2/K_m2$ ($\mu\text{L}/\text{mg}$ protein per min)	515 ± 251	$63 \pm 57^\ddagger$	2335 ± 2367	489 ± 326	810 ± 1109

The kinetic constants were calculated on the basis of the Eadie-Hofstee equation using the data shown in Fig. 19 and 25. Each value represents the mean \pm S.D. (N = 3-4). * $p < 0.05$, significantly different from the K_m1 values of the corresponding cells. $^\dagger p < 0.05$, significantly different from the corresponding values of the control group in astrocytes. $^\ddagger p < 0.05$, significantly different from the corresponding values of the control group. $^\S p < 0.05$, significantly different from the corresponding values of the control group in microglia. This table was cited from Table 3 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

Table 10. Comparison of C/M Ratios, and Efficacy and Capacity of ^{65}Zn Uptake between Astrocytes and Microglia

	Astrocytes	Microglia
Initial phase C/M ratio	120 ± 17	$324 \pm 60^*$
Steady state C/M ratio	1033 ± 137	1139 ± 266
cV_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\mu\text{L}$ cell volume per min)	270 ± 122	$945 \pm 500^*$

The cell volume-corrected V_{\max} was calculated using the V_{\max} values shown in Table 9, and the cell volume of astrocytes and microglia shown in Table 6. Each value represents the mean \pm S.D. (N = 3-4). * $p < 0.05$, significantly different from the values of astrocytes. This table was cited from Table 4 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

2. 亜鉛取り込みにおける ZIP ファミリーの関与

次に、アストロサイト及びミクログリアに発現する ZIP アイソフォームの mRNA 発現量を real-time PCR 法にて調べた。Fig. 20A, B に示すように、両細胞における ZIP アイソフォームの発現プロファイルは類似しており、細胞膜型の ZIP アイソフォームである ZIP1 (Gaither and Eide, 2001a) の発現量は、他のアイソフォームの場合と比較して顕著に高かった。ZIP1 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法にて検討したところ、ミクログリアにおけるその発現量はアストロサイトのそれと比較して有意に高かった (Fig. 21A, B)。さらに、免疫細胞染色法にて、ZIP1 の局在を検討したところ、ZIP1 の免疫活性は、アストロサイト及びミクログリアの細胞膜の指標として用いたそれぞれ cadherin 及び CD11b と共局在した (Fig. 21C)。

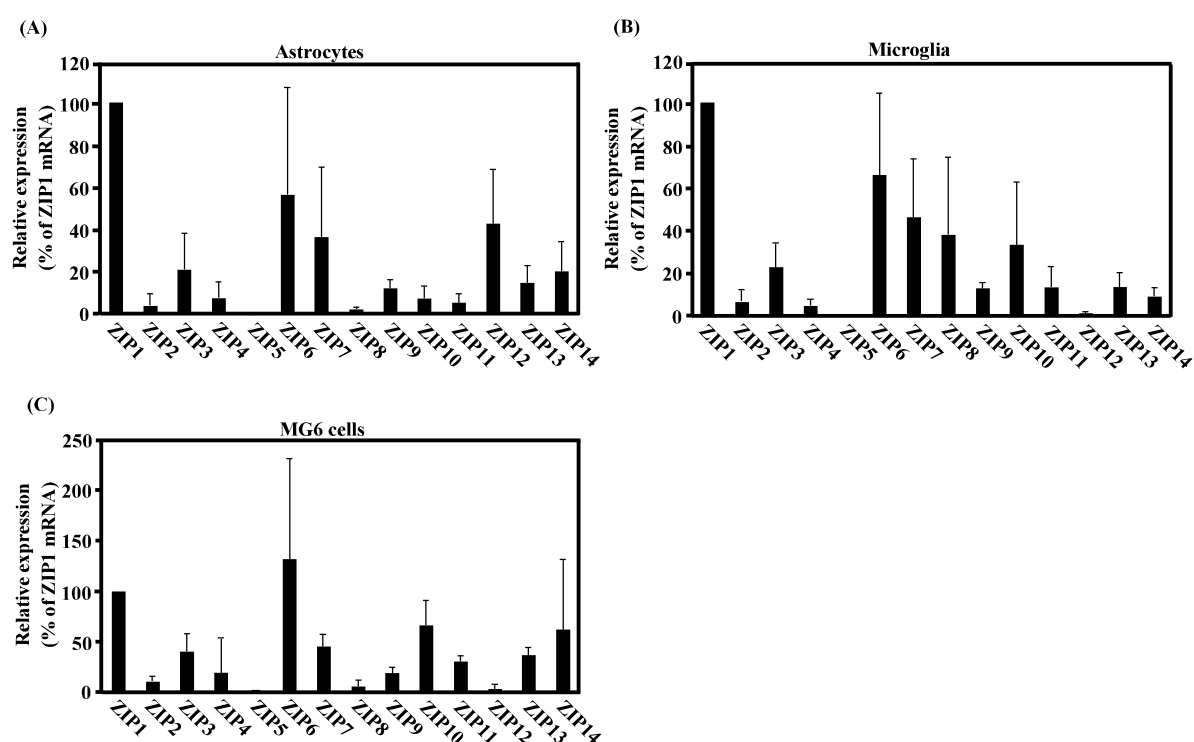


Fig. 20. mRNA Expression of ZIP Isoforms in Mouse Astrocytes, Microglia and MG6 Cells

mRNA expression levels of ZIP isoforms in astrocytes, microglia and MG6 cells were determined by real-time quantitative PCR. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). This figure was cited from Fig. 3 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

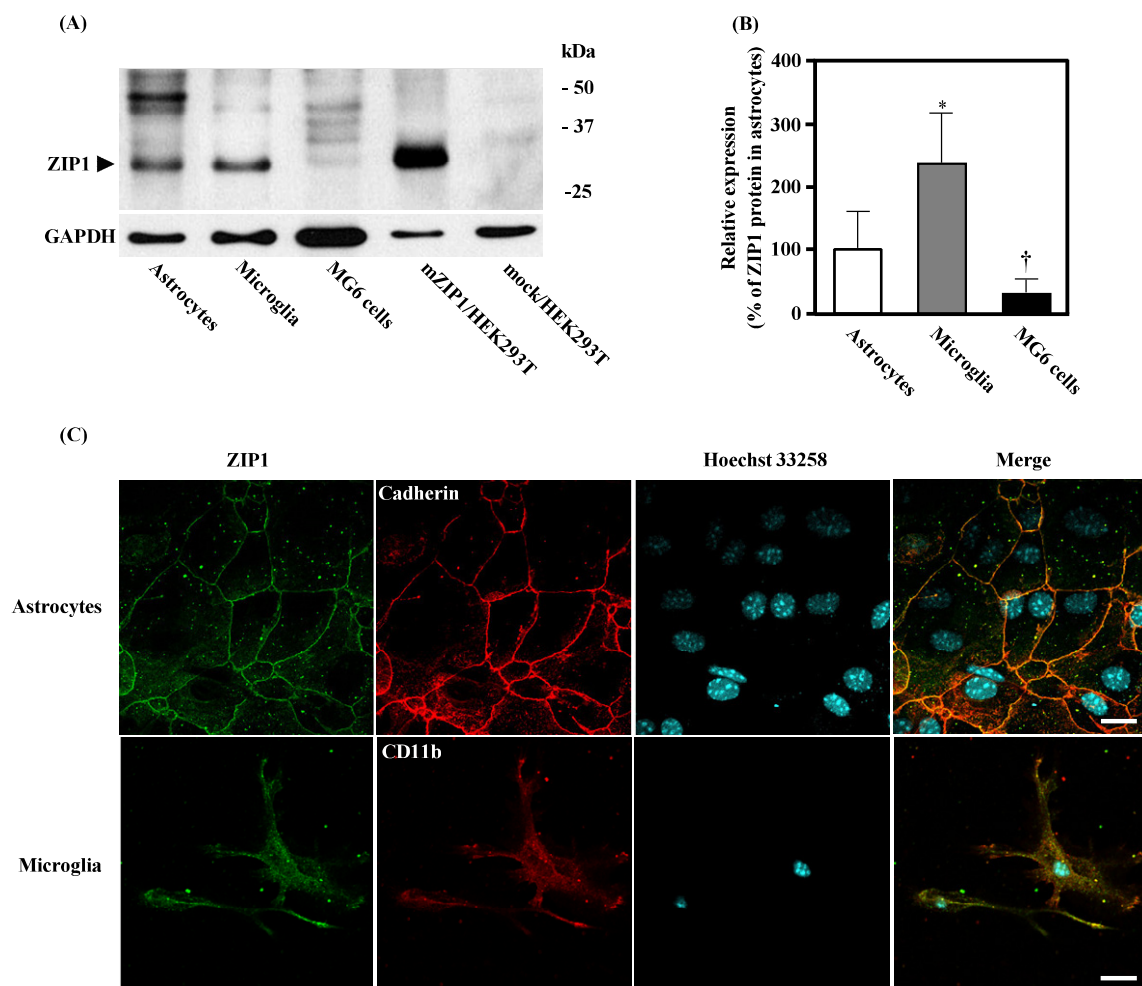


Fig. 21. Protein Expression of ZIP1 in Mouse Astrocytes, Microglia and MG6 Cells

Protein expression of ZIP1 in astrocytes, microglia and MG6 cells was assessed by Western blotting (A, B) and immunocytochemical analyses (C). A representative blot was shown in panel A (N=3), and the quantification results were shown in panel B. As positive and negative controls, we used mZIP1/HEK293T and mock/HEK293T, respectively. In panel C, expression of ZIP1 and cadherin or CD11b, plasma membrane markers in astrocytes and microglia, respectively, were shown as green and red signals, respectively. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258. Each bar represents the mean \pm S.D. (N=3). * and † $p < 0.05$, significantly different from the value of astrocytes and microglia, respectively. Scale bar = 20 μ m. This figure was cited and modified from Fig. 3 in *Metallomics*, **7**, 1067, 2015 and Fig. 3 in *Glia*, **59**, 1933, 2011.

3. ZIP1 の機能評価

アストロサイト及びミクログリアの亜鉛取り込みに対する ZIP1 の関与を明確にするために、mZIP1 過剰発現細胞を用いて ZIP1 の詳細な輸送特性を評価した。Fig. 21A に示すように、ウエスタンブロット法により mZIP1/HEK293T 細胞において ZIP1 の免疫活性に起因するバンドが認められた。さらに、免疫細胞染色法により ZIP1 の発現局在を確認したところ、mock/HEK293T 細胞の場合とは異なり、mZIP1/HEK293T 細胞の細胞膜近傍において ZIP1 の免疫活性が認められた (Fig. 22)。

次に、これらの細胞における ^{65}Zn 取り込みの時間推移を調べたところ、いずれの細胞においても時間依存的な ^{65}Zn の取り込みが認められたが、mZIP1/HEK293T 細胞による ^{65}Zn の取り込みは mock/HEK293T 細胞と比較して顕著に高かった (Fig. 23A)。mZIP1/HEK293T 細胞から mock/HEK293T 細胞の ^{65}Zn の取り込み量を差し引くことにより mZIP1 を介した正味の ^{65}Zn 取り込みを算出したところ、 ^{65}Zn の取り込みは時間依存的であり、1 分まで直線的に増加した (Fig. 23B)。この結果に基づき、以後の実験における ^{65}Zn の初期取り込み速度の評価は 1 分において行った。

Fig. 23C に示すように、 ^{65}Zn の初期取り込み速度は基質濃度増加に伴い上昇し、20 μM 以上において飽和した。この結果を Eadie-Hofstee 解析したところ、これらの取り込み速度とクリアランス (v/s) は、1 本の直線で近似され、この取り込みに関する K_m 値は 5.88 μM 、そして V_{\max} 値は 2472 pmol/mg protein per min と推定された (Table 11)。

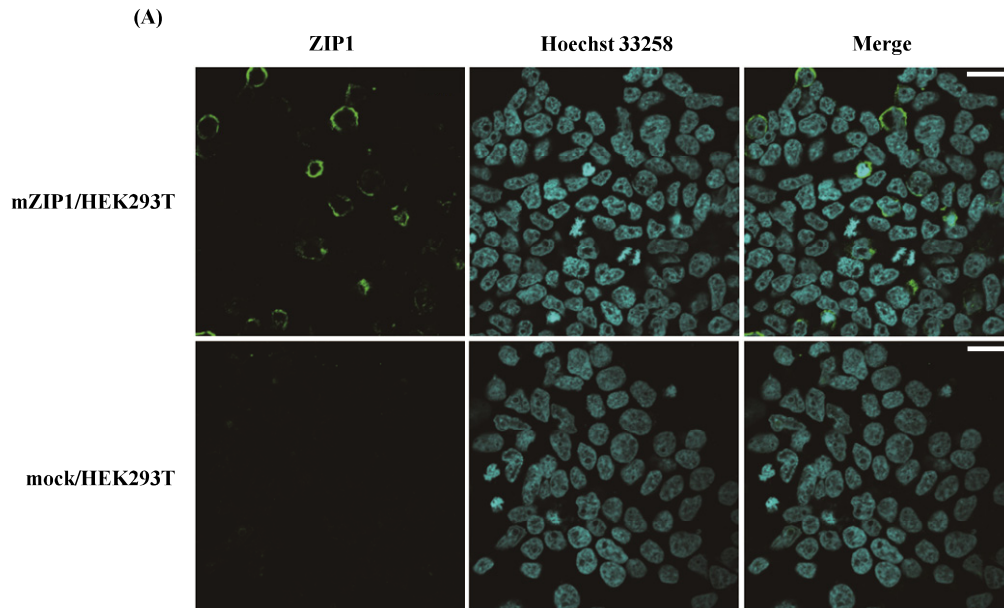


Fig. 22. Protein Expression of mZIP1 in HEK293T Cells Transfected with Its cDNA

HEK293T cells were transfected with the pcDNA3.1/mZIP1 or empty vector for 6 hr, followed by washout, and then they were cultured for 2 days in fresh medium. Thereafter, the cells were used for immunocytochemical analyses (N = 3), and representative photomicrographs were shown. Expression of mZIP1 was shown as green signals, and nuclei were counterstained with Hoechst 33258. Scale bar = 20 μ m. This figure was cited from Fig. 1 in *Life Sci.*, **113**, 40, 2014.

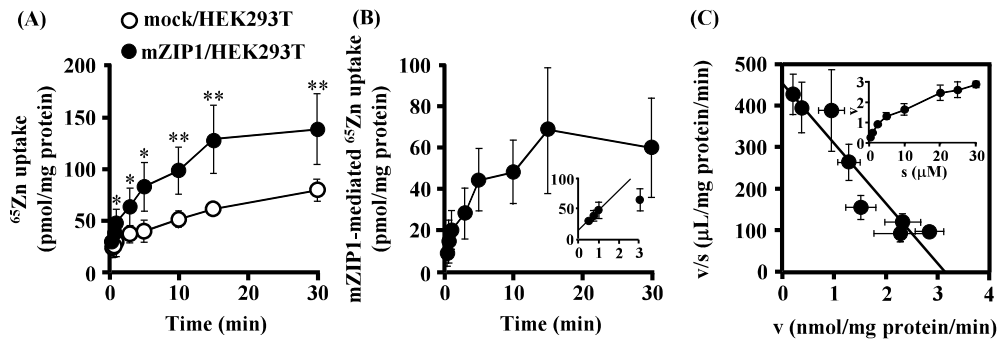


Fig. 23. Time- and Concentration-dependency of ^{65}Zn Uptake by mZIP1

HEK293T cells were transfected with the pcDNA3.1/mZIP1 or empty vector (mZIP1/HEK293T or mock/HEK293T, respectively) for 6 hr, followed by washout, and then they were cultured for 2 days in fresh medium. Thereafter, the cells were used uptake experiments. After the cells had been preincubated in the buffer B for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, they were incubated with 50 nM ZnCl_2 (0.25 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 50 nM ZnCl_2) for the indicated times (A, B) or 0.5–30 μM ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 0.5–30 μM ZnCl_2) for 1 min (C) at 37 $^{\circ}\text{C}$. The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. In panel B, the mZIP1-mediated ^{65}Zn uptakes were calculated by subtracting the uptakes by mock/HEK293T cells from those by mZIP1/HEK293T ones shown in panel A. The inset in panel B shows the linear regression of the initial three time points (up to 1 min), indicating its significant linearity ($r^2=0.996$, $p<0.05$). The inset in panel C shows the concentration- ^{65}Zn uptake profile. Each point represents mean \pm S.D. (N = 4). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, significantly different from the values of the mock/HEK293T group at the corresponding time points. This figure was cited from Fig. 1 and Fig. 2 in *Life Sci.*, **113**, 40, 2014.

4. ZIP1 を介した亜鉛取り込みに対する各種二価金属イオンの影響

さらに mZIP1 の基質特異性を明確にするために、 ^{65}Zn 取り込みに対する各種金属カチオンの影響について検討した。その結果、コントロール群の場合と比較して、鉄及びニッケル存在下において K_m 値はそれぞれ 42.4 及び 16.4 μM と有意に増加したが、 V_{\max} 値はそれぞれ 3219 及び 3313 pmol/mg protein per min と変化はなく (Fig. 24A, C 及び Table 11)、また、コバルトとカドミウムの添加により K_m 値はそれぞれ 10.3 及び 6.36 μM と変化なかったが、 V_{\max} 値はそれぞれ 1265 及び 970 pmol/mg protein per min と有意に低かった (Fig. 24B, D 及び Table 11)。銅は水溶性が低いいため、その阻害様式を推定する実験を行うことはできなかったが、mZIP1 を介した ^{65}Zn 取り込みを約 50%阻害した (Fig. 24E)。一方、マグネシウムとマンガンは、検討した濃度範囲において mZIP1 を介した ^{65}Zn 取り込みに何ら影響しなかった (Fig. 24E)。これらの結果から、鉄及びニッケルは mZIP1 を競合的に阻害するのに対し、コバルトとカドミウムは非競合的に阻害することが明らかとなった。

Table 11. Apparent Kinetic Constants for ^{65}Zn Uptake by mZIP1

	Control	FeCl_2	CoCl_2	NiCl_2	CdCl_2
K_m (μM)	5.88 ± 4.02	$42.4 \pm 13.8^*$	10.3 ± 3.4	$16.4 \pm 1.9^*$	6.36 ± 1.38
V_{\max} (pmol/mg protein per min)	2472 ± 529	3219 ± 665	$1265 \pm 209^*$	3313 ± 974	$970 \pm 98^*$
V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{mg protein per min}$)	559 ± 306	$78 \pm 13^*$	130 ± 34	203 ± 58	155 ± 19
K_i for Zn uptake (μM)	—	0.92 ± 0.44	219 ± 80	28.6 ± 5.5	32.5 ± 5.3

The kinetic constants were calculated on the basis of the Eadie-Hofstee equation using the data shown in Figs. 23 and 24. Each value represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$, significantly different from the values of astrocytes. This table was cited from Table 1 in *Life Sci.*, **113**, 40, 2014.

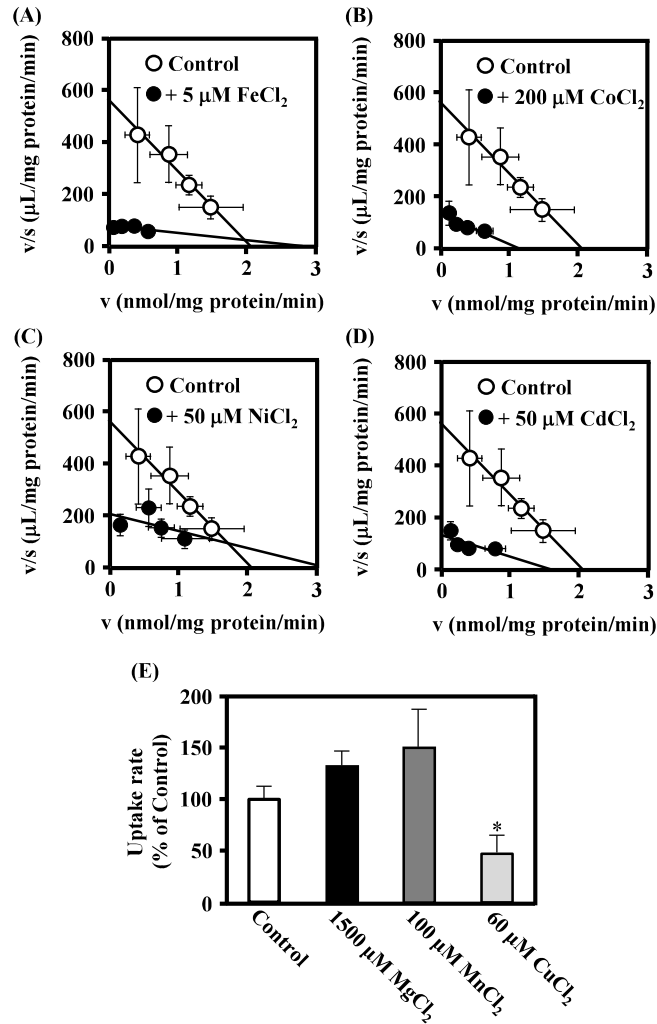


Fig. 24. Effects of Metal Cations on ^{65}Zn uptake by mZIP1

HEK293T cells were transfected with the pcDNA3.1/mZIP1 or empty vector for 6 hr, followed by washout, and then they were cultured for 2 days in fresh medium. Thereafter, the cells were used for uptake experiments. After the cells had been preincubated in the buffer B for 10 min at $37\ ^\circ\text{C}$, they were incubated with $1\text{--}10\ \mu\text{M ZnCl}_2$ ($0.5\ \text{nM } ^{65}\text{ZnCl}_2$ plus $1\text{--}10\ \mu\text{M ZnCl}_2$) in the presence (closed) or absence (opened) of $5\ \mu\text{M FeCl}_2$ (A), $200\ \mu\text{M CoCl}_2$ (B), $50\ \mu\text{M NiCl}_2$ (C) or $50\ \mu\text{M CdCl}_2$ (D) for 1 min at $37\ ^\circ\text{C}$. The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. Each point/bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.01$, significantly different from the value of the control group. This figure was cited from Fig. 3 and Fig. 4 in *Life Sci.*, **113**, 40, 2014.

5. 亜鉛取り込みに対するニッケルの影響

前項の結果より、ニッケルは ZIP1 に対して競合阻害を示すことが明らかになったことから、アストロサイト及びミクログリアによる亜鉛取り込みにおける ZIP1 の関与をより明確にするために、ニッケルの影響について検討した。Fig. 25 に示すように、ニッケル存在下において、両細胞における亜鉛取り込みは低下した。ニッケル存在下での両細胞による亜鉛取り込みの速度論パラメータを求めたところ、ニッケル添加群の K_m1 値はいずれの細胞においてもコントロール群のそれとほぼ等しかったが、 K_m2 値はアストロサイトにおいて $15.16 \mu\text{M}$ 、そしてミクログリアにおいて $16.31 \mu\text{M}$ であり、コントロール群のそれより有意に高かった (Table 9)。一方、両細胞による亜鉛取り込みの $V_{\max1}$ 及び $V_{\max2}$ 値はニッケル存在下で低下傾向にあった。これらの結果と mZIP1/HEK293T 細胞による亜鉛取り込みの K_m 値 ($5.88 \mu\text{M}$) を考慮すると、アストロサイト及びミクログリアによる亜鉛取り込みに関与する低親和性コンポーネントの一部が ZIP1 であると考えられる。

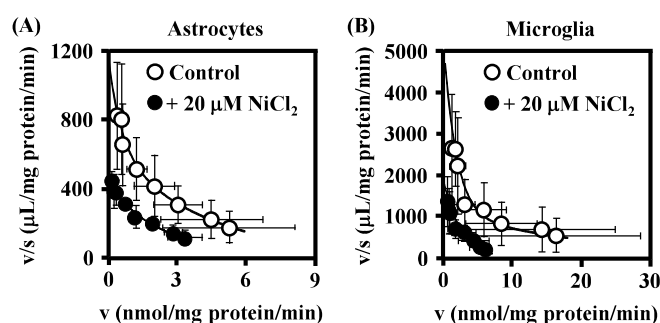


Fig. 25. Inhibitory Effect of NiCl_2 on ^{65}Zn Uptake by Mouse Astrocytes and Microglia

After astrocytes and microglia had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C , they were incubated with $0.5\text{--}30 \mu\text{M}$ ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus $0.5\text{--}30 \mu\text{M}$ ZnCl_2) in the presence (closed) or absence (opened) of $20 \mu\text{M}$ NiCl_2 for 1 min at 37°C . The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. Each point represents the mean \pm S.D. ($N = 3$). This figure was cited from Fig. 4 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

6. 亜鉛取り込みに対する ZIP1 ノックダウンの影響

さらに、アストロサイト及びミクログリアによる亜鉛取り込みに対する ZIP1 ノックダウンの影響について検討した。ミクログリアは、ZIP1 siRNA の導入により、ほぼ全ての細胞が死滅したため、それらを用いての実験を行うことができなかった。そこで、不死化マウスミクログリア細胞株である MG6 細胞 (Takenouchi *et al.*, 2005) をミクログリアの代替細胞として用いることができるか否かを検討した。Figs. 19C, F, 20C 及び 21A, B 並びに Table 9 に示すように、MG6 細胞はミクログリアとほぼ同等の亜鉛取り込み特性及び ZIP アイソフォームの発現プロファイルを有することが明らかとなった。また、MG6 細胞に ZIP1 siRNA を導入しても、細胞傷害性は認められなかった。これらの結果に基づき、ZIP1 ノックダウン実験においてミクログリアの代わりに MG6 細胞を用いることが可能であると判断した。

アストロサイト及び MG6 細胞に対し、ZIP1 に対する siRNA を導入したところ、ZIP1 のタンパク質発現量は、コントロール群のそれと比較して明らかに減少した (Fig. 26A, D)。この時の他の ZIP アイソフォームの発現変動の有無を検討したところ、MG6 細胞では明らかな変化なかったものの、アストロサイトでは ZIP1 のノックダウンによって ZIP3, 4, 6, 8, 9, 11 及び 14 の mRNA 発現量が増加した (Fig. 26B, E)。これらの発現変動は、ZIP1 発現量の減少に起因するものと考えられ、このアストロサイトを用いての亜鉛取り込みに影響を及ぼす可能性が指摘される。しかしながら、Fig. 20A に示すように、無処理アストロサイトにおけるこれら ZIP アイソフォームの発現量は少ないため、ZIP1 ノックダウンアストロサイトにおけるそれら発現量の増加は、その亜鉛取り込みに対する影響は小さいものと推察される。事実、これら細胞における亜鉛取り込みを検証した結果、アストロサイト及び MG6 細胞において、⁶⁵Zn 取り込みは ZIP1 をノックダウンすることにより、コントロール群の場合と比較してそれぞれ 55%及び 71%に低下した (Fig. 26C, F)。したがって、ZIP1 は、アストロサイト並びにミクログリアの代替細胞として用いた MG6 細胞による亜鉛取り込みに寄与する主要な分子であることが示された。

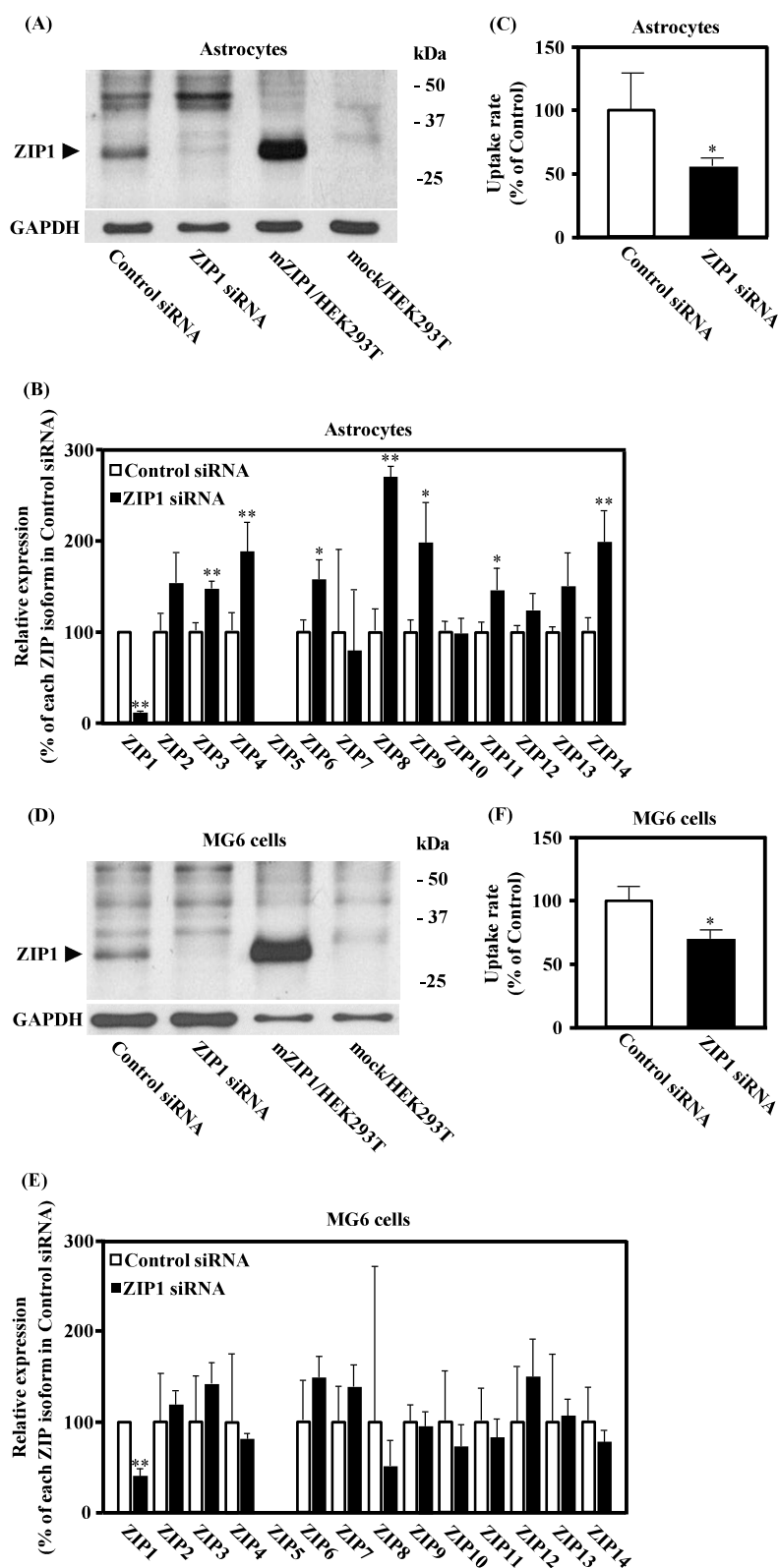


Fig. 26. Effect of ZIP1-knock-down on ^{65}Zn Uptake in Mouse Astrocytes and MG6 Cells

(A, D) Protein expression of ZIP1 in its siRNA-transfected astrocytes and MG6 cells were assessed by Western blotting and a representative blot was shown (N=3). (B, E) mRNA expression levels of ZIP isoforms in siRNA-transfected astrocytes and MG6 cells were assessed by real-time quantitative PCR. (C, F) After astrocytes and MG6 cells transfected with control or ZIP1 siRNA had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C, they were incubated with 0.25 μM ZnCl_2 (2.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 0.25 μM ZnCl_2) for 3 min at 37°C. The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. Each bar represents the mean \pm S.D. (N = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from the value of control siRNA. This figure was cited from Fig. 5 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

7. 亜鉛取り込みに対する L 型カルシウムチャネル阻害剤、グルタミン酸受容体アゴニスト及びエンドサイトーシス阻害剤の影響

これまでに評価してきた亜鉛取り込みへの L 型カルシウムチャネル、AMPA 型グルタミン酸受容体及びエンドサイトーシスの関与の可能性を、アストロサイトにおいて検討した。L 型カルシウムチャネル阻害剤である nifedipine 及び nimodipine、AMPA 型グルタミン酸受容体アゴニストである kainic acid 存在下においてアストロサイトによる ^{65}Zn 取り込みは変化しなかった (Fig. 27A, B)。また、clathrin 依存的エンドサイトーシス阻害剤である sucrose、chlorpromazine (Blanchard *et al.*, 2006; Varea *et al.*, 2006) 及び caveolae 依存的エンドサイトーシス阻害剤である nystatin (Varea *et al.*, 2006) は反応開始後 30 分まで ^{65}Zn 取り込みに影響しなかった。以上の結果から、アストロサイトによる亜鉛取り込みにおいて、L 型カルシウムチャネル、AMPA 型グルタミン酸受容体及びエンドサイトーシスは関与しないか、関与するとしてもその寄与の程度は小さいことが示された。

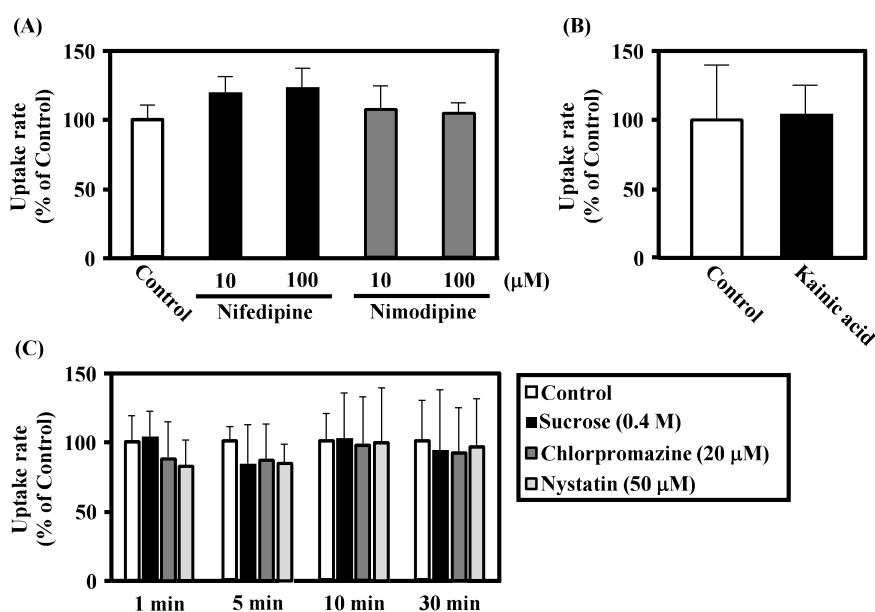


Fig. 27. Effects of L-type Calcium Channel Blockers, a Glutamate Receptor Agonist and Endocytosis Inhibitors on ^{65}Zn Uptake by Mouse Astrocytes

(A) After astrocytes had been preincubated in buffer A in the presence or absence of the indicated concentrations of nifedipine or nimodipine for 10 min at 37°C , they were incubated with $5 \mu\text{M}$ ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus $5 \mu\text{M}$ ZnCl_2) for 1 min at 37°C . (B) After astrocytes had been preincubated in buffer B for 10 min at 37°C , they were incubated with $5 \mu\text{M}$ ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus $5 \mu\text{M}$ ZnCl_2) in the presence or absence of the indicated concentrations of kainic acid for 1 min at 37°C . (C) After astrocytes had been preincubated in buffer A in the presence or absence of the indicated concentrations of an endocytosis inhibitor for 10 min, they were incubated with 50 nM ZnCl_2 (0.5 nM $^{65}\text{ZnCl}_2$ plus 50 nM ZnCl_2) for the indicated times. The reaction was terminated by the addition of an excess volume of ice-cold buffer A, and then cellular ^{65}Zn uptakes were determined. Each bar represents the mean \pm S.D. ($N = 3$). This figure was cited from Fig. 6 in *Metallomics*, 7, 1067, 2015.

考 察

本章では、(1) ミクログリアにおける亜鉛取り込み効率はアストロサイトよりも高いが、亜鉛取り込み能力はほぼ同等であること、並びに (2) ミクログリア及びアストロサイト両細胞における亜鉛取り込みは一部 ZIP1 を介することを明らかにした。

アストロサイト及びミクログリアによる亜鉛取り込みの初期取り込み相における C/M 比はそれぞれ 120 及び 324 であり (Table 10)、これは亜鉛取り込みクリアランスを表す cV_{\max}/K_m 値 (270 及び 945 $\mu\text{L}/\mu\text{L cell volume per min}$) 及び ZIP1 のタンパク質発現量の差異と対応するものであった (Table 10 及び Fig. 21B)。したがって、ミクログリアの亜鉛取り込み効率はアストロサイトのそれよりも高く、その差異は ZIP1 を主要な分子とする亜鉛輸送系の機能的発現によって説明されると考えられる。第 1 章及び第 2 章を通じて、亜鉛は神経伝達物質のみならずグリオ伝達物質として機能し、ミクログリアの活性化を制御すること、並びにミクログリア内への亜鉛の流入が引き金となりミクログリアが活性化することを明らかにした。これらの知見と本章で得られた結果を考え併せると、ミクログリアは脳内環境の変化に対して速やかに応答するために、ストレス負荷された神経細胞から過剰に放出された神経伝達物質としての亜鉛に対する特異的輸送系を介した高い取り込み効率を有していると推察される。

その一方で、定常状態におけるアストロサイト及びミクログリアの C/M 比は 1033 及び 1139 とほぼ同等であった (Table 10)。これは、細胞内に取り込まれた亜鉛が細胞内小器官へ移行すること、及びメタロチオネインなどの金属タンパク質と結合することによって、細胞内遊離型亜鉛レベルが速やかに低下するため、促進拡散系トランスポーターである ZIP ファミリーの取り込み効率は定常状態における亜鉛の細胞内取り込み量に反映しないことで説明できる。メタロチオネインは脳内の亜鉛の恒常性維持に重要な役割を果たすこと (Aschner, 1998)、脳内で最も多い細胞種であるアストロサイト (Koizumi and Inoue, 2004) は、神経細胞よりもメタロチオネインの発現量が高いこと (Chung *et al.*, 2004)、並びにミクログリアには構成的なメタロチオネインは発現しないこと (Hidalgo *et al.*, 2001) を考慮すると、アストロサイトはミクログリアと比較して亜鉛取り込み能力が高く、脳神経系細胞外の亜鉛クリアランスは主としてアストロサイトが担うものと考えられる。また Kruczek ら (2009) は、低浸透圧ストレスに伴った酸化ストレスに曝露されたアストロサイトにおいて、メタロチオネインの発現が増加することを示していることから、酸化ストレスが生じる病態時において亜鉛クリアランスにおけるアストロサイトの寄与はさらに大きくなるものと推察される。

ニッケルは ZIP1 に対して競合阻害を示すことが明らかとなったが、ZIP2, 3, 8, 14 を介した亜鉛取り

込みを阻害することが知られている (Dufner-Beattie *et al.*, 2003; Nebert *et al.*, 2012)。ニッケルは阻害実験において、アストロサイト及びミクログリアの $V_{\max 1}$ 値及び $V_{\max 2}$ 値を減少させたことから両細胞における亜鉛取り込みは ZIP1 に加えて、ZIP2, 3, 8, 14 などのニッケル感受性の輸送系を介する可能性が示唆されるが、それらの寄与の程度は小さいものと推測される。さらに本章における検討では、ミクログリアの活性化を引き起こさない低濃度 (50-250 nM) の亜鉛を添加して実験を行ったことから、得られた知見は生理条件下での脳内の亜鉛恒常性維持において ZIP1 が重要な役割を果たすことを示唆するものである。一方、Emmetsberger ら (2010) は脳の海馬領域において ZIP1 が高発現するが、カイン酸を脳内に投与することで海馬での ZIP4 の発現量は増加することを報告した。また、ZIP14 は IL-6 刺激によりその発現が増加すること (Fujishiro *et al.*, 2014)、並びにアストロサイト及びミクログリアの活性化因子である TNF- α によって ZIP8 の発現が増加することが報告されている (Begum *et al.*, 2002; Besecker *et al.*, 2008; Tzeng *et al.*, 1999)。これらのことから、脳虚血などの病態時には、細胞外に過剰に放出された亜鉛に対応するために ZIP アイソフォームの発現プロファイルが変化し、それにより細胞外亜鉛レベルの制御がなされる可能性が示唆され、今後、これらを解明するために詳細な検討が望まれる。

Varea ら (2006) は、アストロサイトがエンドサイトーシスを介して細胞外の亜鉛を細胞内に取り込むことを報告した。しかしながら、本検討では各種エンドサイトーシスの阻害は、アストロサイトの亜鉛取り込みに影響しなかった (Fig. 27C)。この違いは、Varea らが $K_m 1$ 値及び $K_m 2$ 値よりも高い 10 μ M という亜鉛濃度を用いたことに起因すると考えられる。通常、脳内の細胞外亜鉛濃度は nanomolar で制御されているが (Kitamura *et al.*, 2006)、脳虚血後に一過的に約 300 μ M まで上昇することが知られている (Assaf and Chung, 1984; Frederickson *et al.*, 2006)。したがって、今回著者が明らかにした ZIP1 を含む亜鉛輸送系を介したアストロサイトによる亜鉛取り込みは、生理的状态において機能するのに対し、エンドサイトーシスを介した亜鉛取り込みは細胞外亜鉛濃度が高くなる病態時に機能する可能性が考えられる。

Dufner-Beattie ら (2003) は、mZIP1 に対する各種金属の親和性が亜鉛>ニッケル>鉄=カドミウム=コバルトの順に高いことを報告しており、これは今回著者が得た結果 (鉄>亜鉛>ニッケル=カドミウム>コバルト) (Table 11) と異なっている。彼らは、各種金属の mZIP1 を介した亜鉛取り込みに対する影響を、基質としての亜鉛の 10 及び 50 倍の濃度で反応時間 15 分にて検討していた。これに対し著者は、mZIP1 を介した亜鉛取り込みをその初期取り込み速度 (1 分) で評価し、阻害様式の解析には Eadie-Hofstee 解析を適用した。このような実験条件の相違が、mZIP1 に対する各種金属の親和性の違いを生じたものと考えられる。今回、鉄は ZIP1 に対して亜鉛よりも高い親和性を持つ基質/阻害剤で

あることが明らかとなった。脳において鉄は、神経細胞におけるドーパミンなどの神経伝達物質の合成に重要な役割を果たすと考えられている (Sulzer and Zecca, 2000)。これまで細胞内への鉄の輸送は、三価の鉄がトランスフェリンなどのタンパク質と結合して取り込まれると考えられていたが (Moos and Morgan, 2000)、近年細胞外にトランスフェリン非結合型の鉄が存在し、その大部分が二価カチオンの状態で存在することが報告された (Bleijenberg *et al.*, 1971; Holmes-Hampton *et al.*, 2012)。これらのことは、脳内の鉄の恒常性維持に鉄イオンの動態制御が重要であることを示唆している。しかしながら、TNF- α で活性化されたアストロサイトやミクログリアにおいて鉄の取り込み量が増加することが報告されているものの (Rathore *et al.*, 2012)、グリア細胞における鉄取り込みの生理的意義については不明である。これまでにグリア細胞における鉄の輸送には divalent metal transporter (DMT)-1 が重要な役割を果たすと考えられていたが (Pelizzoni *et al.*, 2012, 2013; Zhang *et al.*, 2013)、脳内における鉄の恒常性維持に DMT-1 だけでなく ZIP1 も関与することが推察される。

以上を総括すると、アストロサイトとミクログリアにおいて、類似した特性を有する亜鉛輸送系が発現しており、その一つが ZIP1 であることが明らかとなった。また、ミクログリアは亜鉛をその活性化のための情報伝達分子とするため、高い取り込み効率を有する亜鉛輸送系を介してそれを迅速に取り込むことことで脳内環境の変化に対して速やかに応答するのに対して、アストロサイトはその高い亜鉛取り込み能力に基づき、脳神経系細胞外の亜鉛クリアランスに中心的な役割を担うと考えられる。

総 括

本研究では、亜鉛を介した神経細胞とグリア細胞との機能連関を明らかにすることを目的として詳細な検討を行い、以下の成績を得た。

第1章において、低浸透圧ストレス負荷されたアストロサイトは細胞外に亜鉛を放出し、この亜鉛はミクログリアの活性化を惹起することが明らかとなった。したがって、亜鉛は神経伝達物質としてのみならず、アストロサイトから放出されるグリオ伝達物質としてミクログリアの活性制御に寄与することが示された。

第2章では、亜鉛によるミクログリアの活性化は、細胞内への亜鉛流入、hemichannel を介した ATP の細胞外放出、オートクリン／パラクリンの P2X7 受容体の活性化、そして NADPH oxidase 及び PARP の活性化を介することが明らかとなった。これは、亜鉛が既知のヌクレオチド-P2 受容体を介したミクログリア活性制御の上流に位置することを明確に示した初めての知見である。

第3章において、アストロサイト及びミクログリアによる亜鉛取り込みは主に ZIP1 などの亜鉛輸送系を介したものであるが、その初期取り込み相における取り込み効率はミクログリアにおいて高いものの、定常状態での取り込み能力は両細胞間でほぼ同等であることを明らかにした。これらのことから、脳内の亜鉛動態制御におけるアストロサイトとミクログリアの役割が異なること、すなわち、ミクログリアは、情報伝達物質として亜鉛を高い取り込み効率で取り込むのに対し、アストロサイトは高い亜鉛取り込み能力を有しており、主として脳神経系細胞外の亜鉛のクリアランスに寄与することと考えられる。

以上の成績に基づき著者は、亜鉛がアストロサイトとミクログリアの機能的連関に関与するグリオ伝達物質である、すなわち、生理的状态において、神経細胞から神経伝達物質として放出された亜鉛は、速やかにアストロサイトによって取り込まれ、その細胞外レベルが低下することで脳内恒常性が維持される一方、脳虚血などの重篤な脳傷害時では、主に神経細胞から過剰に放出された亜鉛はミクログリアを活性化し、それにより初期の神経細胞死が増悪され、さらにこの活性化ミクログリアから生じた酸化ストレスに曝露されたアストロサイトから亜鉛放出が起こり、それによってミクログリアが活性化されることで遅延性の脳傷害が惹起される、という新たな概念を提唱する (Fig. 28)。これらの知見は、脳虚血後の脳神経系ネットワークの破綻に起因する遅発性神経細胞死に対する新たな治療戦略を見出すための極めて有益なものである。

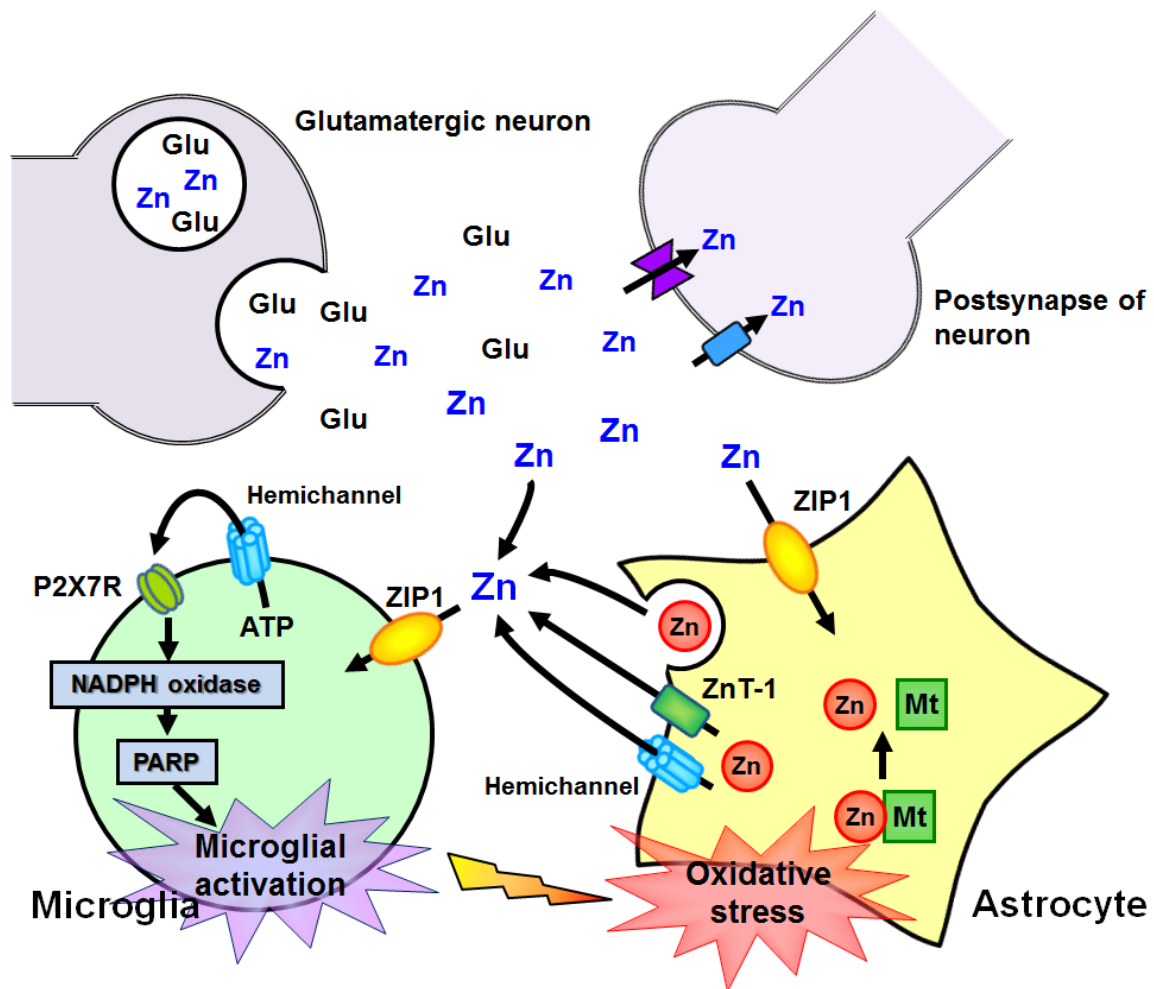


Fig. 28. Proposed Molecular Mechanism Underlying Regulation of the Extracellular Zinc by Astrocytes and Microglia in the CNS

Under physiological conditions, zinc released from the glutamatergic synaptic boutons as a neurotransmitter transmits signals to post-synaptic neurons *via* its receptor and/or channel-mediated incorporation and is also taken up by astrocytes *via* ZIP1 to keep its concentrations in a narrow range. Under stress-loaded conditions, zinc is released excessively from glutamatergic synaptic boutons, and induces microglial activation, resulting in neuronal death. By exposure of astrocytes to oxidative stress generated by the activated microglia, zinc is released from the astrocytes as a gliotransmitter and then microglia are activated, leading late-phase brain injury. Zinc-triggered microglial activation is initiated by the influx of zinc *via* ZIP1, is mediated by ATP release *via* hemichannels and autocrine/paracrine activation of P2X7 receptors, followed by the sequential activation of NADPH oxidase and PARP pathway.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、御懇切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 教授ならびに藤本 貞毅 名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、多大な御助言ならびに御指導を賜りました京都薬科大学 衛生化学分野 西田 健太郎 講師に深謝し、心より御礼申し上げます。

さらに、本論文の作成にあたり、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原 英司 教授ならびに生化学分野 中山 祐治 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

そして、本研究の遂行に際し、直接の御指導と種々の有益な御助言を賜りました高知大学医学部 薬理学講座 東 洋一郎 講師に厚く御礼申し上げます。

また、博士後期課程に入学することを快諾して頂きました沢井製薬株式会社 研究開発本部 横浜重晴 特別顧問 (元取締役 常務執行役員 研究開発本部長)、徳永 雄二 執行役員 製剤研究部長ならびに岸根 秀樹 グループマネージャーに深謝し、心より御礼申し上げます。

末筆ながら、本研究の遂行にあたり、実験の一部に御協力いただきました京都薬科大学 大石 晃弘 学士、古田 能裕 学士をはじめとする衛生化学分野教室員、学士の諸氏に心より御礼申し上げます。

引用文献

- Acuña-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro JP.: Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X₇ purinergic receptor. *J. Neurochem.*, **101**, 17-26 (2007).
- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Callegari MG, Sandonà D, Markwardt F, Schmalzing G, Di Virgilio F.: Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X₇ receptor. *FASEB J.*, **24**, 3393-404 (2010).
- Aguilar-Alonso P, Martinez-Fong D, Pazos-Salazar NG, Brambila E, Gonzalez-Barrios JA, Mejorada A, Flores G, Millan-Perezpeña L, Rubio H, Leon-Chavez BA.: 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.*, **1200**, 89-98 (2008).
- Anderson CM, Nedergaard M.: Emerging challenges of assigning P2X₇ receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.*, **29**, 257-62 (2006).
- Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM.: P2X₄ receptors interact with both P2X₂ and P2X₇ receptors in the form of homotrimers. *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 1069-77 (2011).
- Aschner M.: Metallothionein (MT) isoforms in the central nervous system (CNS): regional and cell-specific distribution and potential functions as an antioxidant. *Neurotoxicology*, **19**, 653-60 (1998).
- Assaf SY, Chung SH.: Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature*, **308**, 734-6 (1984).
- Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R, Nargi E, D'Alimonte I, Traversa U, Rathbone MP, Caciagli F.: Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport*, **13**, 1789-92 (2002).
- Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG.: Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **11**, 164-73 (2011).
- Beaulieu C, Dyck R, Cynader M.: Enrichment of glutamate in zinc-containing terminals of the cat visual cortex. *Neuroreport*, **10**, 861-4 (1992).
- Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T.: Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics*, **80**, 630-45 (2002).
- Bennett MV, Garré JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Sáez JC.: Connexin and pannexin

- hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res.*, **1487**, 3-15 (2012).
- Besecker B, Bao S, Bohacova B, Papp A, Sadee W, Knoell DL.: The human zinc transporter SLC39A8 (ZIP8) is critical in zinc-mediated cytoprotection in lung epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **294**, L1127-36 (2008).
- Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ.: Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.*, **16**, 1324-36 (1996).
- Bitanhirwe BK, Cunningham MG.: Zinc: the brain's dark horse. *Synapse*, **63**, 1029-49 (2009).
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y.: Hepatitis C virus depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, **80**, 6964-72 (2006).
- Bleijenberg BG, Van Eijk HG, Leijnse B.: The determination of non-heme iron and transferrin in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta.*, **31**, 277-81 (1971).
- Block ML, Zecca L, Hong JS.: Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 57-69 (2007).
- Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Górecki DC, Murrell-Lagnado R.: Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13446-54 (2009).
- Braun N, Lenz C, Gillardon F, Zimmermann M, Zimmermann H.: Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.*, **766**, 213-26 (1997).
- Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H.: Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.*, **92**, 1033-43 (2005).
- Calderone A, Jover T, Mashiko T, Noh KM, Tanaka H, Bennett MV, Zukin RS.: Late calcium EDTA rescues hippocampal CA1 neurons from global ischemia-induced death. *J. Neurosci.*, **24**, 9903-13 (2004).
- Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG.: ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, **314**, 1792-5 (2006).
- Chung RS, Adlard PA, Dittmann J, Vickers JC, Chuah MI, West AK.: Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *J. Neurochem.*, **88**, 454-61 (2004).
- Chung RS, Penkowa M, Dittmann J, King CE, Bartlett C, Asmussen JW, Hidalgo J, Carrasco J, Leung YK, Walker AK, Fung SJ, Dunlop SA, Fitzgerald M, Beazley LD, Chuah MI, Vickers JC, West AK.: Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the

- astrocyte-neuron response to injury. *J. Biol. Chem.*, **283**, 15349-58 (2008).
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C.: Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1354-62 (2003).
- Colvin RA.: pH dependence and compartmentalization of zinc transported across plasma membrane of rat cortical neurons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C317-29 (2002).
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ.: Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, **247**, 470-3 (1990).
- Corriden R, Insel PA, Junger WG.: A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293**, C1420-5 (2007).
- Coulter DA, Eid T.: Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*, **60**, 1215-26 (2012).
- Cuajungco MP, Lees GJ.: Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.*, **4**, 137-69 (1997).
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA.: ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J. Neurophysiol.*, **89**, 1870-7 (2003).
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA.: Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, **22**, 391-7 (1999).
- Dufner-Beattie J, Langmade SJ, Wang F, Eide D, Andrews GK.: Structure, function and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 50142-50 (2003).
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR.: Adenine nucleotide undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 7673-82 (1997).
- Emmetsberger J, Mirrione MM, Zhou C, Fernandez-Monreal M, Siddig MM, Ji K, Tsirka SE.: Tissue plasminogen activator alters intracellular sequestration of zinc through interaction with the transporter ZIP4. *J. Neurosci.*, **30**, 6538-47 (2010).
- Eng BH, Guerinet ML, Eide D, Saier MH Jr.: Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.*, **166**, 1-7 (1998).
- Färber K, Kettenmann H.: Purinergic signaling and microglia. *Pflügers Arch.*, **452**, 615-21 (2006).
- Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF.: Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.*, **480**, 317-21 (1989).
- Frederickson CJ, Giblin LJ, Krezel A, McAdoo DJ, Mueller RN, Zeng Y, Balaji RV, Masalha R, Thompson RB, Fierke CA, Sarvey JM, de Valdenegro M, Prough DS, Zornow MH.: Concentration of extracellular free zinc

- (pZn)_e in the central nervous system during simple anesthetization. *Exp. Neurol.*, **198**, 285-93 (2006).
- Fujishiro H, Yoshida M, Nakano Y, Himeno S.: Interleukin-6 enhances manganese accumulation in SH-SY5Y cells: implications of the up-regulation of ZIP14 and the down-regulation of ZnT10. *Metallomics*, **6**, 944-9 (2014).
- Fujita R, Ma Y, Ueda H.: Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *J. Neurochem.*, **107**, 152-60 (2008).
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y.: Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18545-52 (1988).
- Gaither LA, Eide DJ.: The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22258-64 (2001a).
- Gaither LA, Eide DJ.: Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, **14**, 251-70 (2001b).
- Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartskhava N, Schrör K, Häussinger D.: Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia*, **58**, 691-705 (2010).
- Hamby AM, Suh SW, Kauppinen TM, Swanson RA.: Use of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. *Stroke*, **38**, 632-6 (2007).
- Hanamsagar R, Torres V, Kielian T.: Inflammasome activation and IL-1 β /IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia. *J. Neurochem.*, **119**, 736-48 (2011).
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D.: The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.*, **9**, 1512-9 (2006).
- Hedberg KK, Birrell GB, Mobley PL, Griffith OH.: Transition metal chelator TPEN counteracts phorbol ester-induced actin cytoskeletal disruption in C6 rat glioma cells without inhibiting activation or translocation of protein kinase C. *J. Cell Physiol.*, **158**, 337-46 (1994).
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M.: Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, **55**, 133-45 (2001).
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y.: Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. *J. Neurochem.*, **75**, 965-72 (2000).
- Higashi Y, Segawa S, Matsuo T, Nakamura S, Kikkawa Y, Nishida K, Nagasawa K.: Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. *Glia*, **59**, 1933-45 (2011).
- Holmes-Hampton GP, Chakrabarti M, Cockrell AL, McCormick SP, Abbott LC, Lindahl LS, Lindahl PA.: Changing iron content of the mouse brain during development. *Metallomics*, **4**, 761-70 (2012).

- Huang L, Kirschke CP, Zhang Y, Yu YY.: The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15456-63 (2005).
- Huidobro-Toro JP, Lorca RA, Coddou C.: Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur. Biophys. J.*, **37**, 301-14 (2008).
- Hujanen ES, Seppä ST, Virtanen K.: Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1245**, 145-52 (1995).
- Inoue K.: The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.*, **109**, 210-26 (2006).
- Inoue K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H.: Modification of neuropathic pain sensation through microglial ATP receptors. *Purinergic Signal.*, **3**, 311-6 (2007).
- Inoue K.: Purinergic systems in microglia. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3074-80 (2008).
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A.: Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 82-8 (2000).
- Jones KH, Senft JA.: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 77-9 (1985).
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R.: Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science*, **292**, 1178-80 (2001).
- Kanno S, Anuradha CD, Hirano S.: Chemotactic responses of osteoblastic MC3T3-E1 cells toward zinc chloride. *Biol. Trace Elem. Res.*, **83**, 49-55 (2001).
- Kauppinen TM, Higashi Y, Suh SW, Escartin C, Nagasawa K, Swanson RA.: Zinc triggers microglial activation. *J. Neurosci.*, **28**, 5827-35 (2008).
- Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kang TC.: The co-treatments of vigabatrin and P₂X receptor antagonists protect ischemic neuronal cell death in the gerbil hippocampus. *Brain Res.*, **1120**, 151-60 (2006).
- Kim YH, Koh JY.: 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.*, **177**, 407-18 (2002).
- Kirschke CP, Huang L.: Expression of the ZNT (SLC30) family members in the epithelium of the mouse prostate during sexual maturation. *J. Mol. Histol.*, **39**, 359-70 (2008).
- Kitamura Y, Iida Y, Abe J, Mifune M, Kasuya F, Ohta M, Igarashi K, Saito Y, Saji H.: Release of vesicular Zn²⁺ in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res. Bull.*, **69**, 622-5 (2006).
- Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW.: The role of zinc in selective neuronal death after

- transient global cerebral ischemia. *Science*, **272**, 1013-6 (1996).
- Koizumi S, Inoue K.: Regulation by astrocytic ATP of synaptic transmission. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **123**, 389-96 (2004).
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K.: UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, **446**, 1091-5 (2007).
- Kresse W, Sekler I, Hoffmann A, Peters O, Nolte C, Moran A, Kettenmann H.: Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca²⁺ entry in both cultured and *in situ* mouse astrocytes. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1626-34 (2005).
- Kreutzberg GW.: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*, **19**, 312-8 (1996).
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D.: Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*, **57**, 79-92 (2009).
- Kukic I, Kelleher SL, Kiselyov K.: Zn²⁺ efflux through lysosomal exocytosis prevents Zn²⁺-induced toxicity. *J. Cell Sci.*, **127**, 3094-103 (2014).
- Larson AA, Giovengo SL, Shi Q, Velázquez RA, Kovacs KJ.: Zinc in the extracellular area of the central nervous system is necessary for the development of kainic acid-induced persistent hyperalgesia in mice. *Pain*, **86**, 177-84 (2000).
- Lee SJ, Seo BR, Choi EJ, Koh JY.: The role of reciprocal activation of cAbl and Mst1 in the oxidative death of cultured astrocytes. *Glia*, **62**, 639-48 (2014).
- Lichten LA, Cousins RJ.: Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu. Rev. Nutr.*, **29**, 153-76 (2009).
- Liu GJ, Kalous A, Werry EL, Bennett MR.: Purine release from spinal cord microglia after elevation of calcium by glutamate. *Mol. Pharmacol.*, **70**, 851-9 (2006).
- Liu HT, Toychiev AH, Takahashi N, Sabirov RZ, Okada Y.: Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res.*, **18**, 558-65 (2008).
- Lynch MA.: The multifaceted profile of activated microglia. *Mol. Neurobiol.*, **40**, 139-56 (2009).
- Ma Y, Cao W, Wang L, Jiang J, Nie H, Wang B, Wei X, Ying W.: Basal CD38/cyclic ADP-ribose-dependent signaling mediates ATP release and survival of microglia by modulating connexin 43 hemichannels. *Glia*, **62**, 943-55 (2014).
- Marger L, Schubert CR, Bertrand D.: Zinc: an underappreciated modulatory factor of brain function. *Biochem.*

- Pharmacol.*, **91**, 426-435 (2014).
- Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F.: ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem. Int.*, **47**, 442-8 (2005).
- Melani A, Amadio S, Gianfriddo M, Vannucchi MG, Volontè C, Bernardi G, Pedata F, Sancesario G.: P2X₇ receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 974-82 (2006).
- Mingam R, De Smedt V, Amédée T, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R, Layé S.: *In vitro* and *in vivo* evidence for a role of the P2X₇ receptor in the release of IL-1 β in the murine brain. *Brain Behav. Immun.*, **22**, 234-44 (2008).
- Montana V, Verkhatsky A, Parpura V.: Pathological role for exocytotic glutamate release from astrocytes in hepatic encephalopathy. *Curr. Neuropharmacol.*, **12**, 324-33 (2014).
- Montero TD, Orellana JA.: Hemichannels: new pathways for gliotransmitter release. *Neuroscience*, **286**, 45-59 (2015).
- Moore SF, Mackenzie AB.: Species and agonist dependent zinc modulation of endogenous and recombinant ATP-gated P2X₇ receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 1740-7 (2008).
- Moos T, Morgan EH.: Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **20**, 77-95 (2000).
- Moro MA, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I.: Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium*, **36**, 265-75 (2004).
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F.: Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P_{2Z} receptor. *J. Biol. Chem.*, **268**, 8199-203 (1993).
- Nagasawa K, Akagi J, Koma M, Kakuda T, Nagai K, Shimohama S, Fujimoto S.: Transport and toxic mechanism for aluminum citrate in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.*, **79**, 89-97 (2006).
- Nebert DW, Gálvez-Peralta M, Hay EB, Li H, Johansson E, Yin C, Wang B, He L, Soleimani M.: ZIP14 and ZIP8 zinc/bicarbonate symporters in *Xenopus* oocytes: characterization of metal uptake and inhibition. *Metallomics*, **4**, 1218-25 (2012).
- Ni J, Wang P, Zhang J, Chen W, Gu L.: Silencing of the P2X₇ receptor enhances amyloid- β phagocytosis by microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **434**, 363-9 (2013).
- Noh KM, Kim YH, Koh JY.: Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury in mouse cortical cultures. *J. Neurochem.*, **72**, 1609-16 (1999).

- Noh KM, Koh JY.: Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, **20**, RC111 (2000).
- Nolte C, Gore A, Sekler I, Kresse W, Hershfinkel M, Hoffmann A, Kettenmann H, Moran A.: ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. *Glia*, **48**, 145-55 (2004).
- North RA.: Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.*, **82**, 1013-67 (2002).
- Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S.: Involvement of P2X₄ and P2Y₁₂ receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, **55**, 604-16 (2007).
- Orellana JA, Montero TD, von Bernhardi R.: Astrocytes inhibit nitric oxide-dependent Ca²⁺ dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. *Glia*, **61**, 2023-37 (2013).
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R.: Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **282**, 28749-58 (2007).
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA.: Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Arch.*, **452**, 589-97 (2006).
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG.: Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, **369**, 744-7 (1994).
- Pelizzoni I, Zacchetti D, Smith CP, Grohovaz F, Codazzi F.: Expression of divalent metal transporter 1 in primary hippocampal neurons: reconsidering its role in non-transferrin-bound iron influx. *J. Neurochem.*, **120**, 269-78 (2012).
- Pelizzoni I, Zacchetti D, Campanella A, Grohovaz F, Codazzi F.: Iron uptake in quiescent and inflammation-activated astrocytes: a potentially neuroprotective control of iron burden. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1832**, 1326-33 (2013).
- Prasad AS.: Zinc: an overview. *Nutrition*, **11**, 93-9 (1995).
- Qian J, Xu K, Yoo J, Chen TT, Andrews G, Noebels JL.: Knockout of Zn transporters Zip-1 and Zip-3 attenuates seizure-induced CA1 neurodegeneration. *J. Neurosci.*, **31**, 97-104 (2011).
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS.: NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1415-21 (2004).
- Rathore KI, Redensek A, David S.: Iron homeostasis in astrocytes and microglia is differentially regulated by TNF- α and TGF- β 1. *Glia*, **60**, 738-50 (2012).

- Rizzo V, Montalbetti L, Rozza AL, Bolzani W, Porta C, Balduzzi G, Scoglio E, Moratti R.: Nitrite/nitrate balance during photoinduced cerebral ischemia in the rat determined by high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, **798**, 103-8 (1998).
- Rodrigues RJ, Tomé AR, Cunha RA.: ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front. Neurosci.*, **9**, 148-58 (2015).
- Rose CF, Verkhatsky A, Parpura V.: Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1518-24 (2013).
- Ruby CL, O'Connor KM, Ayers-Ringler J, Choi DS.: Adenosine and glutamate in neuroglial interaction: implications for circadian disorders and alcoholism. *Adv. Neurobiol.*, **11**, 103-19 (2014).
- Sanz JM, Di Virgilio F.: Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 β release from microglia cells. *J. Immunol.*, **164**, 4893-8 (2000).
- Scemes E, Giaume C.: Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, **54**, 716-25 (2006).
- Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D.: Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*, **47**, 21-9 (2004).
- Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM.: Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Int.*, **45**, 521-7 (2004).
- Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW.: Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J. Neurosci.*, **17**, 9554-64 (1997).
- Sensi SL, Rockabrand E, Canzoniero LM.: Acidosis enhances toxicity induced by kainite and zinc exposure in aged cultured astrocytes. *Biogerontology*, **7**, 367-74 (2006).
- Seo DR, Kim KY, Lee YB.: Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. *Neuroreport*, **15**, 1157-61 (2004).
- Shen Y, Yang XL.: Zinc modulation of AMPA receptors may be relevant to splice variants in carp retina. *Neurosci. Lett.*, **259**, 177-80 (1998).
- Sirrieh RE, MacLean DM, Jayaraman V.: Amino-terminal domain tetramer organization and structural effects of zinc binding in the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *J. Biol. Chem.*, **288**, 22555-64 (2013).
- Smith SM, Mitchell GS, Friedle SA, Sibigtroth CM, Vinit S, Watters JJ.: Hypoxia attenuates purinergic P2X receptor-induced inflammatory gene expression in brainstem microglia. *Hypoxia (Auckl)*, **2013**, 1-11 (2013).
- St Croix CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR.: Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol.*

- Physiol.*, **282**, L185-92 (2002).
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC.: Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.*, **277**, 10482-8 (2002).
- Sulzer D, Zecca L.: Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.*, **1**, 181-95 (2000).
- Takenouchi T, Ogihara K, Sato M, Kitani H.: Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca^{2+} influx and pore formation induced by the activation of P2X₇ nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1726**, 177-86 (2005).
- Takeuchi H, Suzumura A.: Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 189-200 (2014).
- Tanaka H, Yokota H, Jover T, Cappuccio I, Calderone A, Simionescu M, Bennett MV, Zukin RS.: Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J. Neurosci.*, **24**, 2750-9 (2004).
- Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J.: Tumor necrosis factor- α regulation of the Id gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. *Glia*, **26**, 139-52 (1999).
- Uetsuka S, Fujisawa H, Yasuda H, Shima H, Suzuki M.: Severe cerebral blood flow reduction inhibits nitric oxide synthesis. *J. Neurotrauma*, **19**, 1105-16 (2002).
- Vallee BL, Auld DS.: Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2715-8 (1993).
- Varea E, Alonso-Llosà G, Molowny A, Lopez-Garcia C, Ponsoda X.: Capture of extracellular zinc ions by astrocytes. *Glia*, **54**, 304-15 (2006).
- Verkhratsky A, Kettenmann H.: Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci.*, **19**, 346-52 (1996).
- Verkhratsky A, Kirchhoff F.: Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. *J. Anat.*, **210**, 651-60 (2007).
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A.: Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology*, **36**, 1285-94 (1997).
- Wang H, Guo W, Liu H, Zeng R, Lu M, Chen Z, Xiao Q.: Inhibition of inflammatory mediator release from microglia can treat ischemic/hypoxic brain injury. *Neural. Regen. Res.*, **8**, 1157-68 (2013).
- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T.: A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 879-85 (1981).
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T.: Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell Biol.*, **177**, 637-45 (2007).
- Young MT, Pelegrin P, Surprenant A.: Amino acid residues in the P2X₇ receptor that mediate differential

- sensitivity to ATP and BzATP. *Mol. Pharmacol.*, **71**, 92-100 (2006).
- Zhang HY, Wang ND, Song N, Xu HM, Shi LM, Jiang H, Xie JX.: 6-Hydroxydopamine promotes iron traffic in primary cultured astrocytes. *Biometals*, **26**, 705-14 (2013).
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S.: ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*, **40**, 971-82 (2003).
- Zhang XM, Zhu J.: Kainic acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Curr: Neuroparmacol.*, **9**, 388-98 (2011).