

氏 名 (生年月日) 瀬 川 将 平 (1984 年 11 月 20 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 第 155 号

学位授与の日付 2015 年 9 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 長 澤 一 樹

(副査) 教 授 芦 原 英 司

(副査) 教 授 中 山 祐 治

論 文 内 容 の 要 旨

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否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関連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ー 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ーである 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。

審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は本学位論文において、中枢神経系の恒常性維持において中心的な役割を担う分子の一つである亜鉛の脳内動態制御機構の解明を通じて、グリア細胞であるアストロサイトとミクログリアの機能的連関における亜鉛の役割について検討し、以下の成績を得た。

第1章では、神経伝達物質として機能することが知られている亜鉛が、脳神経系細胞の中で最も細胞数の多いアストロサイトからも放出され、グリオ伝達物質として機能するという仮説を立て、肝性脳症の *in vitro* 実験系として汎用される低浸透圧ストレスを用いて検証された。培養アストロサイトに低浸透圧ストレスを負荷したところ、細胞外における遊離型亜鉛レベルの上昇が認められた。この低浸透圧ストレス負荷アストロサイトの上清を、ミクログリアに作用したところ、その顕著な活性化が惹起され、それは既知の NADPH oxidase 及び PARP の活性化を介したものであった。以上の結果から、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。

第2章では、亜鉛によるミクログリアの活性化機構が精査された。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。亜鉛刺激された培養ミクログリアの細胞外液中の ATP 濃度は control 群のそれと比較して有意に高かったが、hemichannel 阻害剤処理群では細胞外 ATP 濃度に変化はなく、またミクログリアの活性化も認められなかった。ミクログリアには P2X7 受容体を含む種々の P2 受容体の発現が確認され、また亜鉛によるミクログリアの活性化は非選択的 P2 受容体アンタゴニストに加え、P2X7 受容体選択的アンタゴニストによって抑制された。さらにミクログリアの活性化は ATP 及び選択的 P2X7 受容体アゴニスト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-1 活性化を介したものであった。これらの結果は、亜鉛によるミクログリアの活性化が、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-1 の活性化を介することを示しており、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。

第1及び2章において、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が、その脳神経系細胞外におけるクリアランス機構は不明である。そこで第3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が検討された。両細胞による亜鉛取り込みは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ものであり、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、ZIP1であることが明らかとなった。次に、両細胞における亜鉛取り込み効率を比較した結果、初期取り込み相におけるミクログリアによる取り込み効率はアストロサイトよりも高く、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た。これに対し、定常状態における亜鉛取り込み量は両細胞間で差はなかったが、これはアストロサイトが脳神経系細胞外に放出された亜鉛クリアランスを担う主要な細胞であることを示唆すると考察された。

以上の成績は、亜鉛が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を示すとともに、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と考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものであると判断する。