

称号及び氏名 博士(理学) 西川 麻裕

学位授与の日付 平成 29 年 3 月 31 日

論文名 **Studies on Physiological Regulation of Zinc in Murine Neural Stem/Progenitor Cells**  
(マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛制御機構に関する研究)

論文審査委員 主査 原 正之  
副査 児玉 靖司  
副査 佐藤 孝哉

## マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛制御機構に関する研究

### Studies on Physiological Regulation of Zinc in Murine Neural Stem/Progenitor Cells

西川麻裕 (細胞組織工学分野)

#### 序論

必須微量元素である亜鉛は生体内で様々な生理的役割を果たしている。中枢神経系 (central nervous system : CNS) の発生過程には、ニューロンやグリア細胞を生み出す神経幹細胞/前駆細胞 (neural stem/progenitor cell : NSPC) の分化の調節に働く Klf4 や Srft、細胞の移動に必要なマトリクスメタロプロテアーゼ等の様々な亜鉛結合タンパク質が関与しており、妊娠中の亜鉛不足はマウス胎仔で異常な CNS の発達を招くことが知られている。しかしながら、亜鉛が CNS の細胞に及ぼす影響や、その恒常性維持に関する研究の多くは、NSPC から分化・成熟したニューロンやグリア細胞で調べられている。自己複製能と多分化能を有する NSPC は *in vitro* で培養できるため、難治性中枢神経系疾患に対する細胞移植治療や薬効試験に用いられており、CNS における亜鉛制御機構について調べるうえでも有力な実験材料になり得ると考えた。

本研究では、NSPC 及びその分化誘導細胞に対する亜鉛の影響を評価し、NSPC の分化過程における亜鉛制御タンパク質の発現を解析した。はじめに、NSPC とその分化誘導細胞の生存と分化に対する亜鉛の影響を評価した。続いて、細胞内における亜鉛の恒常性は主に金属結合性タンパク質であるメタロチオネインと細胞内外へ亜鉛を輸送する亜鉛トランスポーターによって維持されていることから、NSPC の分化過程におけるこれら亜鉛制御タンパク質の発現解析を行った。

#### Chapter 1 マウス神経幹細胞/前駆細胞の分化に伴う細胞の亜鉛耐性上昇と MT 遺伝子の発現との関連

脳の生理機能や発生過程における亜鉛の重要性が認識されているものの、NSPC の生存や分化に及ぼす影響、至適濃度については不明であり、NSPC における亜鉛制御タンパク質に関する報告もほとんどない。NSPC を用いた亜鉛の影響評価は、CNS の発生に関わる亜鉛制御機構を明らかにするとともに、NSPC の培養法の改良にも役立つと予想される。

亜鉛は必須元素である一方で、毒性が強いカドミウムや水銀と同族元素の重金属でもあることから、細胞生存への影響評価では NSPC と分化誘導した細胞で培地中の亜鉛濃度に対する半数阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を比較した。また、亜鉛曝露した分化誘導細胞のニューロンやアストロサイトへの分化率の解析も行った。さらに、分化や亜鉛曝露による MT の誘導性を明らかにするため、MT の遺伝子発現を解析した。

##### 【実験】

胎齢 14 日目の ICR マウス大脳から採取し、細胞増殖因子 (20 ng/mL EGF, 20 ng/mL b-FGF) を含む培地で維持した NSPC と、1% ウシ胎児血清を含む培地で NSPC を 7 日間培

養しニューロンとアストロサイトに分化誘導した細胞（以下、分化誘導細胞）を用意した。それぞれの細胞群に対して亜鉛および同族の重金属溶液（ $ZnCl_2$ ,  $CdCl_2$ ,  $HgCl_2$ ）を種々の濃度で添加し、24 時間後に WST 法により細胞の生存率を測定した。その結果をもとに、細胞生存に影響を与えない濃度の  $ZnCl_2$  (20, 50, 100  $\mu M$ ) に 24 時間曝露した分化誘導細胞を免疫染色し、細胞集団中におけるニューロンとアストロサイトの割合を求めた。

また、リアルタイム PCR 法により NSPC の分化誘導前後における MT ファミリー遺伝子 (*Mt1*, *Mt2*, *Mt3*, *Mt4*) の発現量を解析した。 $ZnCl_2$  溶液 (20, 35, 50  $\mu M$ ) を添加して 24 時間培養した細胞においても同様に遺伝子発現解析を行った。

### 【結果および考察】

NSPC は分化することでより高濃度の重金属イオン存在下でも生存できるようになることが示された。特に、亜鉛に対する細胞の耐性は NSPC では  $IC_{50}$  値が 76  $\mu M$ 、分化誘導細胞では 128  $\mu M$  と比較的大きく変化した (Fig. 1)。興奮時のシナプス間隙などでは亜鉛濃度が 300  $\mu M$  以上に達することも知られており、細胞毒性が現れないための調節機構が中枢神経系では重要な役割をもつことが示唆された。生存に影響を与えない濃度での亜鉛曝露では、分化誘導細胞集団中のニューロン、アストロサイトのいずれかに特異的な細胞死は認められなかった。

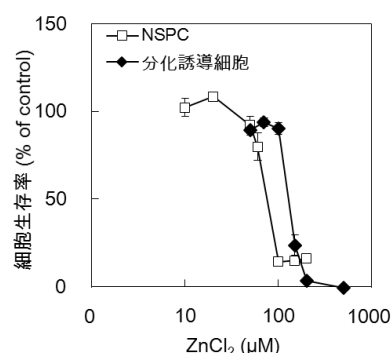


Fig. 1 細胞生存に対する影響評価

また、4 種類の MT 遺伝子はいずれも NSPC よりも分化誘導細胞で 5 倍以上高く発現していることが示された (Fig. 2)。この結果から、NSPC は分化すると遊離状態の亜鉛と結合し無毒化する能力が高まるために、亜鉛に対する細胞の耐性が上昇したと考えられる。さらに、NSPC、分化誘導細胞ともに *Mt1*, *Mt2* の発現は培地中の亜鉛濃度依存的に誘導されたが、*Mt3* は亜鉛濃度によらず発現量が一定であった。*Mt4* も亜鉛濃度依存的な発現増加傾向が示されたが、完全に濃度依存的ではなかった。NSPC、分化誘導細胞のいずれも亜鉛曝露時に細胞内の MT を増量できることが示された。

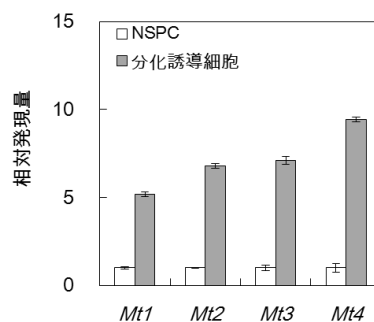


Fig. 2 MT 遺伝子発現量

## Chapter 2 マウス神経幹細胞/前駆細胞の分化過程における亜鉛トランスポーター群の発現解析

細胞における亜鉛恒常性の維持には、MT による亜鉛の貯蔵に加えて、細胞膜を介した亜鉛の輸送も重要である。哺乳類の亜鉛トランスポーターには、細胞質内へ亜鉛イオンを取り込む ZIP トランスポーター 14 種類と、細胞質から亜鉛イオンを排出する ZnT トランスポ

ーター9種類が存在する。これらは組織や細胞の種類ごとに特異的に発現することが明らかにされつつあるが、NSPCにおける発現傾向に関しては報告例がない。Chapter 1で得られた結果から、NSPCからの分化によって亜鉛耐性が高まった理由がMTの増加以外にもあるかどうかを確かめるため、細胞内への亜鉛取り込みを担うZIPトランスポーターを中心に、NSPCにおける亜鉛トランスポーターの発現解析を行った。各種亜鉛トランスポーターの発現量が分化誘導により変動するか調べるため、NSPCと分化誘導細胞で遺伝子発現量を比較した。NSPCで高発現するトランスポーターについては、免疫染色法により培養NSPCとマウス胎仔脳組織におけるタンパク質発現を確認した。

### 【実験】

NSPC及び分化誘導細胞よりRNAを抽出し、リアルタイムPCR法で亜鉛トランスポーター遺伝子 (*Zip1~14*, *Znt1*, *Znt2*) の発現量を解析した。分化誘導により顕著な発現量変動を示したトランスポーターについては、分化誘導時間に変化を与え、分化誘導時間に対する遺伝子発現の変化を解析した。さらに、亜鉛曝露によってそれらの発現が誘導されるか検証するため、 $ZnCl_2$  溶液 (20, 35, 50  $\mu M$ ) を添加して24時間培養したNSPCと分化誘導細胞でも遺伝子発現解析を行った。さらに、*Zip8* の発現がNotchシグナルによって制御されているか確かめるため、Notchシグナル阻害剤であるDAPT (5  $\mu M$ ) を添加して24時間培養したNSPCにおける*Zip8* の発現をリアルタイムPCR法で解析した。また、NSPCを7日間培養して形成させた細胞集塊 (ニューロスフェア) と胎齢14日目のマウス大脳の薄切片を免疫染色し、ZIP8タンパク質の発現を確認した。

### 【結果と考察】

NSPCの分化過程における亜鉛トランスポーター群の発現傾向を初めて明らかにした。全14種類の*Zip*のうち、*Zip4*と*Zip12*は分化誘導細胞でそれぞれ約20倍、約200倍と特に大きく発現量が増加した。一方、NSPCで高い発現傾向を示したのは*Zip8*だけで分化誘導細胞に比べて約4倍高く発現していた (Fig. 3)。

この結果から、*Mt*の場合とは異なり、すべての*Zip*遺伝子が同様の発現変動を示すわけではないことが判明した。*Zip4*, *Zip8*, *Zip12*について、分化誘導に伴う経時的な発現量解析を行った結果、これらの発現は、NSPCのマーカーである*Nestin*の発現量が減少し、分化細胞のマーカーである*Tubulin  $\beta$  III*と*Gfap*の発現が上昇すると連動して変動することが明らかになった。また、*Zip4*, *Zip8*, *Zip12*は細胞周囲の亜鉛による発現誘導がみられず、NSPC、分化誘導細胞のいずれにおいてもほぼ一定の発現量を示した。したがって、NSPCの分化前後の細胞では、細胞内への亜鉛取り込みに必要となるZIPトランスポーターの種類が変化することが示唆された。

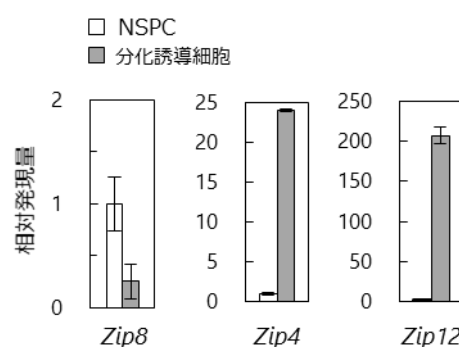


Fig. 3 Zip 遺伝子発現量

ZIP8 タンパク質の発現を免疫組織化学染色法により確認したところ、ニューロスフェアにおいては、特に集塊表面の神経幹細胞特異的マーカーNestin に陽性の細胞が認められる領域で発現していた。また、脳組織においても NSPC の局在部位である脳室壁周辺で ZIP8 タンパク質の発現が認められた。したがって、培養細胞と脳組織のいずれにおいても ZIP8 タンパク質が NSPC で発現していることを確認することができた。(Fig. 4)

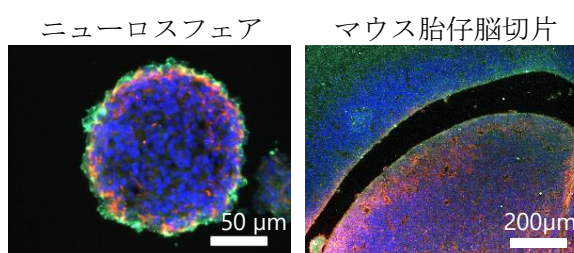


Fig.4 ニューロスフェアと胎仔脳組織における ZIP8 タンパク質の発現  
(緑 : ZIP8、赤 : Nestin、青 : 核)

## 総括

亜鉛は CNS の神経発生過程に重要であると知られていながら、NSPC における役割や制御機構については調べられてこなかった。本研究では、高濃度の亜鉛が NSPC、アストロサイトとニューロンからなる分化誘導細胞の生存に毒性を及ぼすものの、分化誘導後の細胞は NSPC よりも高い亜鉛耐性を示すことを見出した。培養下で亜鉛濃度を調節することにより、細胞種を制限して選択的に培養する技術が可能となるかもしれない。

分化誘導細胞は 4 種類の *Mt* を NSPC に比べて高発現しており、そのために高い亜鉛耐性を獲得できたと示唆された。また、NSPC の分化誘導前後における ZIP トランスポーターの発現傾向を初めて明らかにした。NSPC では *Zip8*、分化誘導細胞では *Zip4*、*Zip12* の発現量が顕著に高く、これらの発現変動は未分化/分化マーカーの発現が変化すると連動して生じた。よって、CNS の発生段階によって亜鉛を取り込むために必要とされる ZIP トランスポーターの種類が変化すると考えられる。

本研究において NSPC の亜鉛耐性の仕組みを理解するための基礎的な知見が初めて得られ、ZIP8 タンパク質が新規 NSPC 表面マーカーになり得る可能性も示唆された。これらの知見は、今後中枢神経系疾患に対する再生医療や創薬の実現に必要な NSPC を安定供給するための、培養法の改良への利用なども期待される。

## 文献

- 1) Nishikawa M, Mori H, Hara M. Reduced zinc cytotoxicity following differentiation of neural stem/progenitor cells into neurons and glial cells is associated with upregulation of metallothioneins, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39, 3, 1170-1176 (2015)
- 2) Mori H, Sasaki G, Nishikawa M, Hara M. Effect of subcytotoxic cadmium on morphology of glial fibrillary acidic protein network in astrocytes derived from murine neural stem/progenitor cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 2, 639-644 (2015)

## 学位論文審査結果の要旨

平成29年2月23日

学位論文提出者氏名： 西川 麻裕

学位論文題目： Studies on Physiological Regulation of Zinc in Murine Neural Stem / Progenitor Cells (マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛制御機構に関する研究)

本学位論文は、Chapter 1 (マウス神経幹細胞/前駆細胞の分化に伴う細胞の亜鉛耐性上昇と MT 遺伝子の発現との関連)、Chapter 2 (マウス神経幹細胞/前駆細胞の分化過程における亜鉛トランスポーター群の発現解析) から成る。

神経幹細胞/前駆細胞(NSPC: neural stem progenitor cell)は自己複製能と、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を持つ細胞である。細胞生存試験ではマウス NSPC よりも分化誘導細胞が、亜鉛及び同族重金属イオンに対して高い耐性を示した。非致死濃度での曝露では、ニューロンとアストロサイトへの分化率は変化しなかった。

細胞内の亜鉛濃度は、主に金属結合性タンパク質メタロチオネイン (metallothionein : MT) と亜鉛輸送体 (トランスポーター) が維持している。今回 RT-PCR 法による MT 遺伝子発現解析により、マウスに存在する 4 種類の MT 遺伝子 (*Mt1*, *Mt2*, *Mt3*, *Mt4*) は、いずれも NSPC よりも分化誘導細胞で 5 倍以上高く発現した。*Mt1*, *Mt2* の発現上昇は亜鉛濃度依存的、*Mt3*, *Mt4* は非依存性であった。細胞分化後に MT が増えて細胞の亜鉛耐性が上昇したと考えられた。

亜鉛輸送体には、細胞質内へ取り込む ZIP トランスポーター14 種類と、細胞外や小胞内に排出する ZnT トランスポーター9 種類があり、組織・細胞特異的に発現するが、NSPC においては報告例がない。全 14 種類の *Zip* のうち、*Zip4* と *Zip12* は分化誘導細胞でそれぞれ約 20 倍、約 200 倍と大きく発現上昇し、*Zip8* のみが逆に NSPC で分化誘導細胞より約 4 倍高く発現した。細胞分化時のこれら 3 種の発現は、NSPC マーカー *Nestin* の発現量低下、分化細胞マーカーの *TubulinβIII* と *Gfap* の発現上昇と連動して変化したが、亜鉛によっては発現誘導されなかった。NSPC において唯一高発現していた *Zip8* のタンパク質発現を免疫組織化学染色法により確認すると、生体外 (*in vitro*) で培養したニューロスフェアでは中心部よりも集塊表面で神経幹細胞特異的マーカー *Nestin* 陽性の細胞が認められ、生体内 (*in vivo*) の胎仔脳組織でも NSPC の局在部位である脳室壁周辺で ZIP8 タンパク質の発現が認められた。

本学位論文審査委員会は、当該論文が神経幹細胞/前駆細胞に対する亜鉛の細胞毒性とその調節機構を初めて明らかにした新規の知見を含む研究であり、博士 (理学) の学位を授与するのに相当であると結論した。