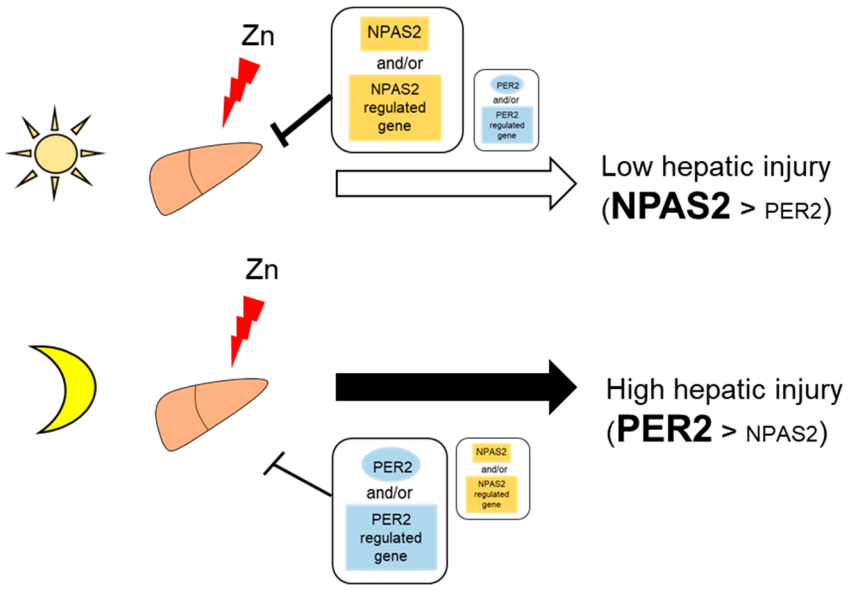
188　感受性時刻差を示す金属毒性に対する時計遺伝子の役割	吉岡　弘毅

【目的】生物には 24 時間を 1 つの周期とした概日リズムが存在し、血圧や体温など生理的条件下においても様々な因子が変動していることが知られている。これまでに私は、毒性学と時間生物学をあわせた「時間毒性学」の研究を展開し、致死を指標とした金属曝露の感受性時刻差を明らかにしてきた。本研究では、代表的な必須微量元素である亜鉛に対する感受性時刻差を示す機序を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】7 週齢の ICR 系雄性マウスを実験に用いた。10 時（ZT2）または 22 時（ZT14）の 2 つの時刻に対して、塩化亜鉛（32.3 mg/kg）をそれぞれ腹腔内投与し、3、6、12 および 24 時間後に血液と肝臓を採取して、肝障害マーカー（ALT、AST）および肝臓中の亜鉛量とメタロチオネイン量を測定した。さらに、マウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 細胞を用いて、硫酸亜鉛（100～500 μM）で 24 時間処理した際の細胞生存率を AlamarBlue によって評価し、200 μM 亜鉛で処理した際の時計遺伝子の発現レベルを測定するとともに、*Per2* および *Npas2* を過剰発現させた条件下で亜鉛の毒性が変化するかどうか評価した。

【結果】致死毒性試験の結果から ZT2（低感受性）と ZT14（高感受性）の二時刻を用いたが、ALT および AST は ZT14 の方が高値を示し、致死毒性試験の結果を反映したものになった。その一方で、肝臓中の亜鉛蓄積量、メタロチオネイン量に差は認められなかった。Hepa1-6 細胞を用いた実験では、アポトーシスが認められる濃度（200 μM）において、時計遺伝子の *Per2* と *Npas2* が有意に減少した。この二種類の時計遺伝子を過剰発現させると、亜鉛による毒性が軽減された。*Per2* は夜中に発現量が高く、*Npas2* は日中に高い特徴を有する。これらのバランスによって、亜鉛に対する感受性時刻差が認められる可能性が示唆された。

想定される亜鉛による肝障害の感受性時刻差の機序



188. 感受性時刻差を示す金属毒性に対する時計遺伝子の役割

吉岡　弘毅

岐阜医療科学大学 薬学部

Key words：時間毒性，亜鉛，時計遺伝子，肝障害

緒　言

生物には、24 時間を 1 つの周期とした概日リズムが存在し、血圧や体温など生理的条件下においても様々な因子が変動していることが知られている［1］。病気と発症時刻の関連性も報告されており、気管支喘息は深夜に発症しやすい［2］。このように、24 時間周期の生体反応に応じて、処方時刻が調節されている医薬品も多い。生体リズムを考慮に入れること、つまり薬を投与する時刻を考慮した投与法を研究する「時間薬理学」は、臨床の現場においても時間薬理治療として注目されている。しかし、生体防御に関する「時間毒性学」の研究は、時間薬理学と比べるとほとんど行われておらず、その知見は乏しい。

これまでに私は時間毒性学の研究を展開し、特に金属の毒性に対する研究を行ってきた。カドミウムについては、朝に投与するとすべてのマウスが死亡するが、夜中ではすべてのマウスが生存するというゼロヒャクの結果を示した。また、カドミウム以外の金属においても検討を行い［3］、ニッケルはカドミウムと同様のパターンを示した。その一方で、銅や亜鉛については、カドミウムとは異なり、朝よりも夜の投与で毒性が強く顕れる結果となった。また、鉄では感受性時刻差は認められなかった。これらの結果から、用いる金属によって固有の感受性時刻差を有することが示唆される。

亜鉛は必須微量元素であり、成人の生体では 2 g ほど含まれている。亜鉛の重要性は広く知られており、欠乏すると味覚異常や食欲不振などが引き起こされる。また、過剰症も知られており、医薬品の過剰服用や鉄鋼関係で勤務する人は酸化亜鉛の蒸気を吸い込むことで発症し、消化器や肝臓へ毒性が認められる。亜鉛に対する感受性時刻差の検討は過去に我々が示した報告しか存在せず、感受性時刻差を示す因子は不明である。そこで本研究では、亜鉛による肝障害に着目し、感受性時刻差を示す因子の解明を目指した。

方　法

1. 2 時刻での亜鉛曝露に対する経時的な肝障害評価

実験には、7 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。10 時（ZT2）または 22 時（ZT14）の 2 つの時刻に対して、塩化亜鉛（32.3 mg/kg）をそれぞれ腹腔内投与し、3、6、12 および 24 時間後に血液と肝臓を採取した。血液は遠心分離を行い、血漿を得て、肝障害マーカー（ALT、AST）を測定した。肝臓中の亜鉛量は過塩素酸と硝酸を混ぜた溶液で灰化を行なったあと、原子吸光 Z-2300 にて測定した。メタロチオネイン量は 0.25 M スクロースで肝臓を破砕処理後に、Cd による置換反応を行うことで測定を行った（Cd-hem 法、Z-2300）。

2. 亜鉛毒性における時計遺伝子の関与の検証

細胞はマウス肝癌由来細胞株 Hepa1-6 細胞を用いた。

1）96 well plate に 10,000 細胞播種し、24 時間後に硫化亜鉛（100～500 μM）で 24 時間処理した際の細胞生存率を AlamarBlue によって評価した。

2）24 well plate に 100,000 細胞播種し、24 時間後に硫化亜鉛（200 μM）で 24 時間処理した後に、Apotracker Green によってアポトーシスの有無を評価した。
3）6 well plate に 500,000 細胞播種し、24 時間後に硫化亜鉛（200 μM）で 24 時間処理した後に、RNA を抽出し、逆転写キットにより cDNA を得た後、各種時計遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって測定した。
4）細胞播種 3 時間後に pcDNA-neo-*Per2* または pcDNA-neo-*Npas2* をリポフェクション法により一過性過剰発現させ、細胞増殖試験（AlamarBlue）、アポトーシス（Apotracker Green）によって前述の時計遺伝子により亜鉛による毒性が軽減されるか検証した。

結果および考察

1. 投与時刻の違いによる亜鉛に対する肝障害の影響

過去に実施した致死毒性試験において［3］、差の大きかった 2 時刻（ZT2：明期、ZT14：暗期）を用いて亜鉛に対する肝障害を非致死量で検討した。ZT2（10 時投与）において、投与 3 時間後から、血漿中の AST および ALT 値の増加傾向が認められ、AST 値は 6 時間、ALT 値は 12 時間後から有意な増加が確認された（図 1A、B）。これに対して、ZT14（22 時）においては、ZT2 よりも肝障害の程度が強く、AST 値は投与 3 時間後、ALT 値は 6 時間後から有意な増加が認められた。この結果から、致死毒性試験と同様に非致死量においても肝障害の程度が異なるとともにそのパターンは投与量に依存しないことが明らかになった。

肝障害の程度が異なる原因として、肝臓中の亜鉛蓄積量の違いによるものか、生体内の防御機構に差のあることによるものかが推察される。肝臓中の亜鉛蓄積量を原子吸光法にて測定した結果、投与時刻依存的に亜鉛蓄積量の増加が確認されたが、2 時刻でその差は認められなかった（図 1C）。この結果から後者の生体内の防御機構に起因することが示唆された。メタロチオネインは亜鉛の毒性防御において、重要な因子であることが報告されているため［4］、肝臓中のメタロチオネイン量を Cd-hem 法にて測定した。亜鉛の蓄積量と同様に、投与時間依存的にその発現量は増加したが、2 時刻で差は認められなかった（図 1D）。以上の結果から、メタロチオネイン以外の抗酸化物質等に時刻差があり、その違いが亜鉛による肝障害の感受性時刻を示す要因になることが示唆された。

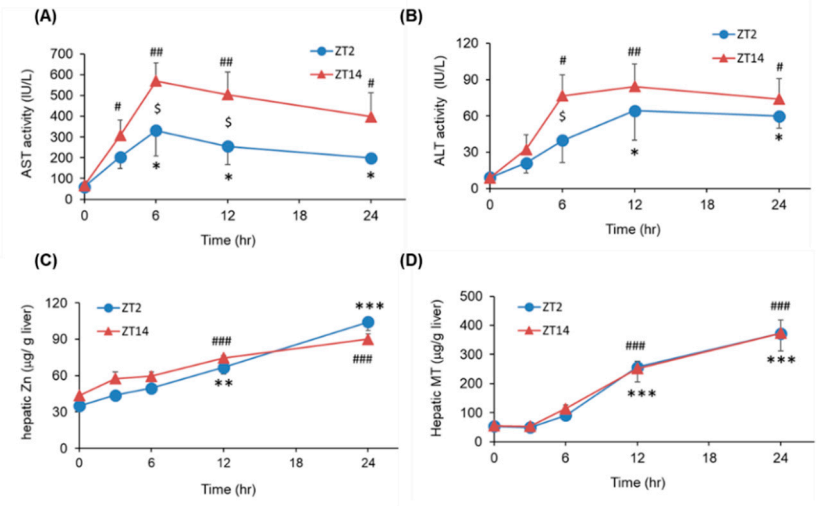


図 1. 投与時刻の違いによる亜鉛に対する肝障害および蓄積量の評価

A） ZT2（10 時）または ZT14（22 時）に亜鉛を投与し、3、6、12 および 24 時間後の血漿中 AST 値を示す。
B） ZT2 または ZT14 に亜鉛を投与し、3、6、12 および 24 時間後の血漿中 ALT 値を示す。
C） ZT2 または ZT14 に亜鉛を投与し、3、6、12 および 24 時間後の肝臓中亜鉛量を示す。
D） ZT2 または ZT14 に亜鉛を投与し、3、6、12 および 24 時間後の肝臓中メタロチオネイン量を示す。
$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ versus control at ZT2（Tukey's test）。$^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ and $^{\#\#\#}P<0.001$ versus control at ZT14（Tukey's test）。$^{\$}P<0.05$ vs ZT2 at same time（t-test）。

2. 亜鉛処理による細胞毒性評価と時計遺伝子発現変動

次に感受性時刻差を示す因子を詳細に検討するために、Hepa1-6 細胞を用いた実験を行った。亜鉛で 24 時間処理した際の細胞毒性を AlamarBlue によって評価したところ、濃度依存的に細胞数の減少が確認された（図 2A）。次に、200 μM の濃度において、アポトーシスが観察されるか検討した結果、アポトーシス陽性細胞が亜鉛処理によって認められた。この結果から、亜鉛による細胞数の減少はアポトーシスに起因すると考えられた（図 2B）。時計遺伝子は概日リズムの形成だけでなく、抗酸化作用など様々な機能を示すことが明らかにされつつある [1]。そこで、亜鉛処理（200 μM、24 時間）によって時計遺伝子が変動するかどうかリアルタイム PCR によって測定したところ、*Per2* と *Npas2* の 2 つの時計遺伝子で有意な減少が認められた（図 2C）。

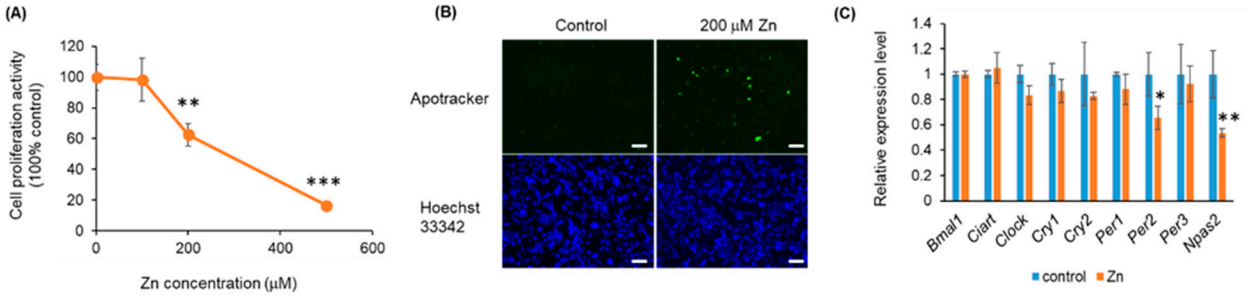


図 2. 亜鉛処理による細胞毒性評価と時計遺伝子発現変動

A) Hepa1-6 細胞に対して、亜鉛を 24 時間処理した際の細胞生存率を示す。

B) 亜鉛を 24 時間処理した際のアポトーシスの有無の検討。アポトーシス陽性細胞は緑色の蛍光を発する。スケールバー：100 μm。

C) 亜鉛を 24 時間処理した際の 9 種類の時計遺伝子発現量を示す。

*$P<0.05$, **$P<0.01$ and ***$P<0.001$ versus control（A は Tukey's test、C は t-test）。

3. 亜鉛毒性に対する *Per2* および *Npas2* の影響

亜鉛毒性に対して、*Per2* および *Npas2* が影響するかどうか各遺伝子をコードした発現ベクターを作製し、評価した。各時計遺伝子を過剰発現させることでそれらの発現量が有意に増加することを確認した（図 3A）。この条件下で細胞増殖試験を行ったところ、亜鉛による細胞増殖抑制が完全に防御できることを明らかにした（図 3B）。また、アポトーシスにおいても *Per2* や *Npas2* を過剰発現させると陽性細胞が消失する結果になった（図 3C）。亜鉛を処理することで、過剰発現させた *Per2* や *Npas2* が減少したため（図 3A）、これらの時計遺伝子が抗酸化作用を示す可能性が考えられた。また、*Per2* は夜中に高く、*Npas2* は朝に高い特徴を持つ時計遺伝子である。これらの時計遺伝子の発現量のバランスによって亜鉛による肝障害が異なる可能性が示唆される。今後、遺伝子改変動物を用いた実験で解明するべきであると考えられる。

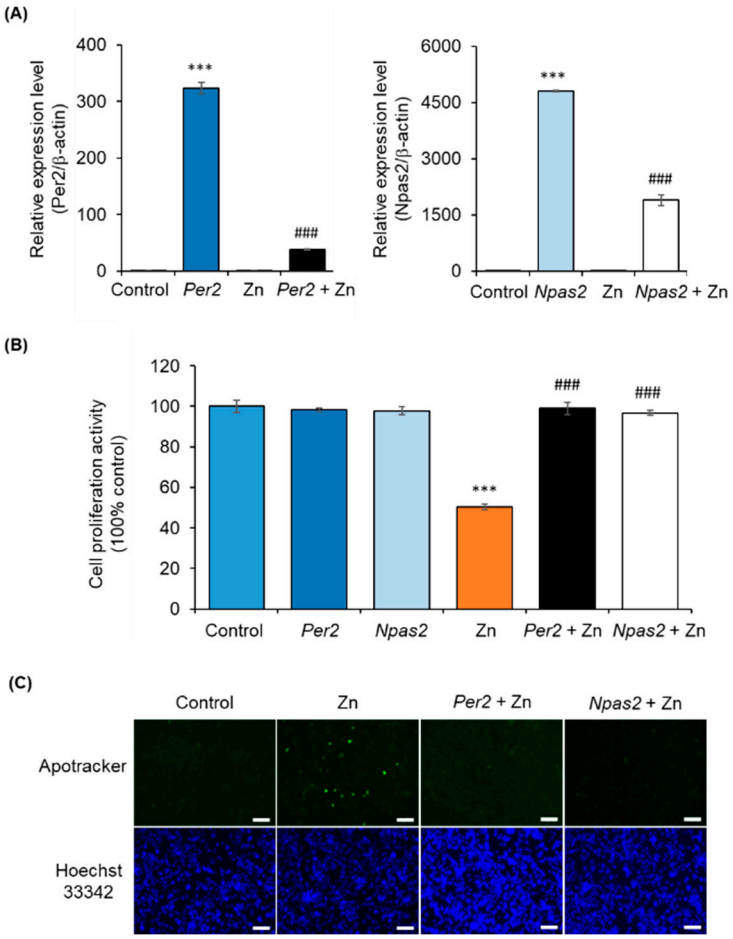


図 3. 亜鉛毒性に対する Per2 および Npas2 の防御作用

A) *Per2* および *Npas2* を過剰発現させた際の亜鉛処理に対する各時計遺伝子の発現変動結果を示す。

B) *Per2* および *Npas2* を過剰発現させた際の亜鉛処理に対する細胞生存率を示す。

C) *Per2* および *Npas2* を過剰発現させた際の亜鉛処理に対するアポトーシスの有無の検討。アポトーシス陽性細胞は緑色の蛍光を発する（スケールバー：100 μ m）。

$^{***}P<0.001$ versus control、$^{\#\#\#}P<0.001$ versus Per2 or Npas2（Tukey's test）。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、横浜薬科大学薬学部健康薬学科の三浦伸彦教授に有益なご助言を頂戴した。この場を借りて感謝申し上げたい。

文　献

1) F Rijo-Ferreira, J Takahashi, Genomics of circadian rhythms in health and disease, Genome Med. 2019 Dec 17;11(1):82. PMID: 31847894, DOI: 10.1186/s13073-019-0704-0.

2) F Levi, U Schibler, Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications, Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007:47:593-628.PMID: 17209800, DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208.

3) H Yoshioka, T Nonogaki, Y Shinohara, M Suzui, Y Mori, G Hwang, K Ohtani, N Miura, Lethal chronotoxicity induced by seven metal compounds in mice, J Toxicol Sci. 2018;43(2):129-134. PMID: 29479034, DOI: 10.2131/jts.43.129.
4) R Palmiter, Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 6;101(14):4918-23. PMID: 15041749, DOI: 10.1073/pnas.0401022101.