

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16133

研究課題名(和文)メチル水銀が示すコレステロール代謝因子の脳特異的発現誘導とその意義

研究課題名(英文)The role of cholesterol hydroxylase against methylmercury-induced neurotoxic effects

研究代表者

岩井 美幸 (Iwai-Shimada, Miyuki)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・研究員

研究者番号：80723957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メチル水銀投与マウスの脳内で、コレステロール25-水酸化酵素(CH25H)が顕著に発現上昇することを明らかにした。さらにその発現が、マウス脳内のGFAP陽性細胞(アストロサイト)で観察されることを見出した。siRNAによるCH25Hの発現抑制下で、メチル水銀を処理した場合のメチル水銀感受性を評価した結果、C17.2細胞(神経前駆細胞)、BV2細胞(ミクログリア)およびC8-D1A細胞(アストロサイト)の3種類のマウス神経細胞すべてで、メチル水銀に対する感受性が増加することを確認した。これらの結果は、CH25Hがメチル水銀毒性に対して防御的な役割を果たす可能性を示唆していた。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury is an environmental contaminant with a selective toxicity for the central nervous system. However, the mechanism of toxicity selective to the nervous system is not well understood. The mRNA expression of CH25H was specifically increased in the brain by administration of methylmercury. On the double staining of immunostaining and in situ hybridization, CH25H mRNA expression was observed in GFAP positive cell on the mouse brain. Moreover, we found that the knockdown of CH25H increased the toxicity of methylmercury in C17.2 cells, BV2 cells and C8-D1A cells. These results are suggesting that the CH25H plays a key role in the defense mechanism against toxicity of methylmercury.

研究分野：衛生薬学

キーワード：メチル水銀 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は重篤な中枢神経障害を引き起こす環境汚染物質である。しかし、メチル水銀による毒性発現機構およびそれに対する生体防御機構は未だ不明な点が多い。これまでにメチル水銀を投与したマウス脳内の遺伝子発現解析により、コレステロール25-水酸化酵素(CH25H)を同定している。CH25Hはコレステロールを水酸化する酵素で、リポ多糖(LPS)などの刺激に伴って誘導されることが明らかになっているものの、メチル水銀によって誘導されることはこれまでに報告されていない。したがって、メチル水銀によるCH25H発現誘導が、脳内のコレステロール恒常性に影響を与え、その結果として脳が選択的に障害される可能性が考えられ、メチル水銀の毒性機構解明に新たな成果を与えると考えられ、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、メチル水銀投与後のCH25Hの発現変動と発現局在、細胞レベルでのCH25H誘導の意義について、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) メチル水銀投与後のマウス脳中でのCH25H発現誘導(経時変化および投与量依存性、発現部位、発現局在)を明らかにする。
- (2) 脳由来神経培養細胞におけるメチル水銀のCH25H発現誘導とメチル水銀毒性との関係を検討し、その毒性学的な意義を明らかにする。
- (3) CH25Hがコードするコレステロール25水酸化酵素発現抑制およびその代謝産物がメチル水銀毒性に与える影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) メチル水銀投与後のマウス脳中でのCH25H発現誘導

C57BL/6 雄性マウス(7週齢)に塩化メチル水銀 25mg/kg 体重(as Hg)を皮下単回投与し、1、3、5、7日目にそれぞれ解剖した(経時的検討)。また0、10、15、20、25mg/kg 体重(as Hg)を投与し、投与量依存性に関する実験も実施した(投与量依存性の検討)。大脳、小脳、肝臓、腎臓をそれぞれ摘出した。RNA抽出はIsogen kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用い、cDNA合成はPrimeScript RT reagent kit (Takara, Japan)、定量PCRはSYBER Premix Ex Taq (Takara)を使用し、Thermal Cycler Dice (Takara)により実施した。1または7日目には灌流固定した脳をin situ hybridization法(ISH)および免疫染色(GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein または Iba1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1)による二重染色を実施し、発現部位と発現局在を検討した。

(2) 脳由来神経培養細胞におけるメチル水銀のCH25H発現誘導

細胞レベルでのメチル水銀のCH25Hの発現誘導については、次の3種類の神経細胞をもいいて検討した。DMEM(10% FBS含有)中でマウス神経前駆細胞(C17.2細胞)、ミクログリア細胞(BV2細胞: C57BL/6 brain)およびアストロサイト(C8-D1A細胞: C57BL/6 cerebellum)を培養し、試験に用いた。

メチル水銀処理は、6-well plateに 4×10^5 cells/1.8mL/wellとなるようにC17.2細胞、BV2細胞、C8-D1A細胞を播種し、24時間、37度、5%CO₂で培養後、200μLのメチル水銀溶液(最終濃度0~10μM)になるように添加し、0~6時間培養し、それぞれ適した時間に試料を回収した(RNA抽出から定量PCRまでは(1)と同様のため省略)。

(3) CH25Hがコードするコレステロール25水酸化酵素発現抑制およびその代謝産物に関する検討

siRNA を用いた CH25H 発現抑制では、トランスフェクション試薬として HiPerFect (Qiagen, Germany) を用い、CH25H の異なる領域から作成した 3 種類の siRNA と HiPerFect Reagent を反応させトランスフェクション・コンプレックスを形成させたのち細胞懸濁液とともに 6-well plate に 4×10^5 cells/1.8mL/well または 96well plate に 1×10^4 /90 μ L/well となるように C17.2 細胞、BV2 細胞および C8-D1A 細胞をそれぞれ蒔いた。siRNA 処理から 48 時間後に、メチル水銀処理を行い、その 6 時間後の CH25H ノックダウン効率および AlamarBlue による細胞生存率を指標としてメチル水銀感受性を評価した。

CH25H により生成される 25-水酸化コレステロールを添加した後に、メチル水銀を処理した場合のメチル水銀感受性を評価した。さらに CH25H の siRNA 処理後に、25-水酸化コレステロールを添加した条件において、メチル水銀を処理した場合のメチル水銀感受性も評価した。

4. 研究成果

(1) メチル水銀投与後のマウス脳中での CH25H 発現誘導

メチル水銀を投与したマウス組織中における CH25H の発現は、投与 1 日目から大脳、小脳、腎臓で顕著に上昇した。メチル水銀蓄積量との関係を考えると、脳では 1 日目の段階では腎臓と比べメチル水銀濃度は高くなかず、少ないメチル水銀量であるにもかかわらず、脳での発現上昇は顕著であった。投与 3 日目に CH25H の発現は 2 倍程度まで下がるものの 5 日目、7 日目と再び 10 倍程度まで発現が上昇した。また投与量に伴って、大脳及び小脳について CH25H の発現が上昇する投与量依存的な関係も確認された。

投与 1 日目および 7 日目 ISH の結果、マウス脳を矢状断で見た場合、嗅球、大脳皮質、

小脳、海馬、視床、視床下部、中脳、橋と広範囲にわたる脳部位で顕著な発現が見られ、特に 7 日目より 1 日目の発現が多く確認された。

ISH による CH25H 発現部位と Iba1 の発現箇所は重複がみられなかった一方で、GFAP とは重複がみられたことから、アストロサイトで CH25H が発現していると考えられた。

以上の結果より、メチル水銀投与 1 日目より脳で発現が顕著に上昇することが明らかとなり、さらに脳内のアストロサイトでの発現が確認された。また投与 1 日目は、脳組織中での病理変化（神経細胞数の減少）は認められていないことから、毒性発現前に CH25H の発現が上昇していると考えられた。

(2) 脳由来神経培養細胞におけるメチル水銀の CH25H 発現誘導

メチル水銀による CH25H の発現誘導は C17.2 細胞、BV2 細胞、C8-D1A 細胞でも認められた。メチル水銀処理 0, 0.5, 2.5, 5, 10 μ M をそれぞれ添加し、6 時間後の CH25H の発現を見ると、5 μ M で 2 倍程度、10 μ M で 6-7 倍まで発現が上昇した。メチル水銀処理 (10 μ M) 条件下、3 時間後から発現上昇が見られ、6 時間後さらに発現が上昇した。メチル水銀処理 3 時間後では 85-90%近い細胞が生存しており、6 時間でも 60%程度は生存していることから、CH25H の発現レベル上昇は、メチル水銀に対する細胞応答反応であると考えられた。

(3) CH25H がコードするコレステロール 25 水酸化酵素発現抑制およびその代謝産物に関する検討

3 種類の siRNA を用い CH25H のノックダウン効率を算出し、一番ノックダウン効率の良い siRNA (未処理時 87%減、メチル水銀処理時 81%減) を実験に用いた。C17.2 細胞、BV2 細胞および C8-D1A 細胞で、siRNA 処理

後にメチル水銀を添加し、その感受性を評価した結果、すべての細胞で高感受性を示した。さらに、siRNAによりCH25Hの発現を抑制条件で25-水酸化コレステロールを添加した後メチル水銀処理をした場合もほとんど相違は認められなかった。siRNAを導入しない場合でも同様の結果であった。

以上の結果から、CH25Hの代謝産物である25-水酸化コレステロールの毒性軽減への寄与は小さいと推察された。一方、CH25Hのノックダウンによりメチル水銀感受性の増加がすべての細胞で認められていることから、CH25Hの発現誘導は、メチル水銀毒性に対して防御的な役割を果たしていることを示唆しており、本知見は、メチル水銀の毒性機構解明に新たな成果を与えたと考えられた。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

岩井美幸, 龍田希, 黒川修行, 仲井邦彦, 永沼章, 佐藤洋(2015). 胎児期の残留性有機汚染物質曝露と出生体重および発達との関連性. 第42回日本毒性学会学術年会, S12-5(招待講演), 2015年6月30日、ホテル日航金沢(石川県・金沢市)

岩井美幸, 黄基旭, 金ミンソク, 高橋勉, 永沼章(2016). メチル水銀曝露によるマウス脳内でのコレステロール25-水酸化酵素の発現誘導とその意義. フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 222. 2016年9月11日、昭和大学旗の台キャンパス(東京都・品川区)

〔図書〕(計1件)

岩井美幸 (2016) ぐらしの環境と健康. 山本玲子編, 衛生・公衆衛生学 社会や環境のシステムと健康との関わり. アイ・ケイコーポレーション, 235-254 (2016).

6．研究組織

(1)研究代表者・所属・職名

岩井美幸 (IWAI-SHIMADA MIYUKI)・国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター・研究員

研究者番号：80723957