

令和元年6月20日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00564

研究課題名(和文)有機ヒ素化合物による小脳症状とグリア細胞：脳内ヒ素代謝とグルタチオン制御の破綻

研究課題名(英文)Organic arsenic compound-induced neurological symptoms and glutathione in astrocytes

研究代表者

根岸 隆之(Negishi, Takayuki)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80453489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸(DPAA)が引き起こす神経症状の発症メカニズムの解明を目指し、脳のなかの神経細胞を栄養的・機能的に支持するアストロサイトと、アストロサイトが神経細胞や脳そのものを護るために産生するグルタチオンに注目しDPAAの影響を評価したところ、アストロサイトがDPAAを無毒化するために良かれと合成する抗酸化物質グルタチオンが逆にDPAAを活性化し、アストロサイトの異常活性化をひき起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジフェニルアルシン酸(DPAA)は他のヒ素化合物と異なり神経症状を特徴的に引き起こす。普通、化学物質による神経症状発症メカニズムの解明というとその物質の神経細胞に対する毒性の調査というイメージになるが、本研究ではこれまでの知見から脳の主役とみられることの多い神経細胞ではなく、その守護者であるアストロサイトに注目し、DPAA アストロサイトの異常活性化 神経細胞の機能異常 神経症状という仮説をたて、DPAAによるアストロサイトの異常活性化と脳を守る武器であるグルタチオンの皮肉な関係を明らかにすることで、化学物質が脳に与える影響の多様性と複雑さを提示することができた。

研究成果の概要(英文)：Diphenylarsinic acid (DPAA) is the pentavalent arsenic chemical found in the arsenic poisoning in Kamisu, Ibaraki, Japan 2003, where people using contaminated water suffered from neurological symptoms including cerebellar symptoms. In the present study, we tried to reveal the mechanism of DPAA-induced neurological symptoms, focusing on astrocytes, the guardian cells in brain, and glutathione, an endogenous potent antioxidant, which they could produce against various brain-damaging toxicants. The present results suggested that glutathione produced against DPAA in astrocytes could chemically activate DPAA and, ironically, this glutathione-conjugated DPAA might be the very true culprit in DPAA-induced abnormal activation of astrocytes and neurological symptoms.

研究分野：神経毒性学

キーワード：有機ヒ素化合物 アストロサイト グルタチオン 細胞死

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ジフェニルアルシン酸 (DPAA) は、戦時に毒ガス兵器であるジフェニルクロロアルシンやジフェニルシアノアルシンの原料として用いられた化合物であり、2003年に茨城県神栖町で発生した井戸水ヒ素汚染事故の主因物質である。この事故では原料である DPAA (注: DPAA は毒ガスでは無い) を含むコンクリートブロックが混入した土壌が神栖町での埋め立てに用いられたために発生したが、その正確な経緯は未だ不明である。そして、DPAA 汚染井戸水を飲用した住民が脳血流量の変化によると思われる頭痛や振戦・協調運動障害といった小脳症状を主徴とする神経症状を発症した。この神経症状は井戸水使用中止後も長く残り、そこで出生した子供には発達障害も現れている。申請者はこれまでにラット小脳神経系細胞初代混合培養系(神経細胞、アストロサイト、ミクログリア共存)における網羅的遺伝子発現解析からスタートし、*in vitro* および *in vivo* で種々の分子生物学的手法を用いて「DPAA は小脳のアストロサイトにおいて酸化ストレス応答因子の発現と神経・血管作動性サイトカインの放出を促す」ことを明らかにした。ここで注目すべきは「DPAA はアストロサイトに選択的に影響を与える」というものであった。アストロサイトとは脳を構成するグリア細胞の一つであり、神経細胞を機能的・栄養的に支えるとともに血液脳関門の脳側のゲートとなっている。従って、DPAA によるアストロサイトの活性化とサイトカインの過剰放出が小脳症状や脳血流異常の原因であるという作業仮説を立てた。続いて、発達期ラットに事故時に近い濃度の DPAA を飲水曝露すると生化学的には小脳における可逆的な酸化ストレスダメージとグルタチオン濃度の低下、そして行動学的には可逆的な小脳症状とみられる歩行異常と多動及び非可逆的な記憶学習障害が生じることを明らかにした。さらにラット小脳由来培養アストロサイトにおける DPAA 曝露による細胞増殖、MAP キナーゼと転写因子の異常活性化、およびそれによる神経・血管作動性サイトカイン群の異常放出を明らかにした。そして、本研究のカギとなる結果であるが、「DPAA はアストロサイトにおいて細胞外へのグルタチオンの放出を誘発する」ということを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究は「有機ヒ素化合物による小脳症状とグリア細胞：脳内ヒ素代謝とグルタチオン制御の破綻」と題して、茨城県の井戸水ヒ素汚染事故の主因物質であるジフェニルアルシン酸 (DPAA) が引き起こす小脳症状の発症メカニズムの解明を目指す。脳のグリア細胞アストロサイトと脳を化学物質や酸化ストレスから守る分子であるグルタチオンに注目し、分子生物学的研究と分析化学的研究を連携させて、「アストロサイトにおける DPAA のグルタチオン抱合(代謝)による化学形態変化とそれによるアストロサイトの活性化こそが DPAA の影響の本態であり、小脳症状は DPAA による神経細胞の機能変調というより DPAA により暴走したアストロサイトが狂わせた神経細胞集団の表現型である」というストーリーを立証を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では主に生後2日目の Wistar ラット小脳由来の培養アストロサイトを用いた。ラット小脳由来アストロサイトは血清含有 DMEM/F-12 にて増殖培養を行い、薬物等ばく露は無血清 ITS-X 含有 DMEM/F-12 を用いて行った。種々の株化細胞は ATCC より購入し、増殖させたのちに薬物等ばく露に供した。細胞生存率やグルタチオン濃度の測定は市販のキットを用いて行った。タンパク質発現解析のための Westernblotting 等は定法に従って行った。

### 4. 研究成果

#### 1) DPAA とグルタチオン

ラット小脳由来アストロサイトに DPAA をばく露すると一過性の細胞増殖とそれに続く細胞死、MAP キナーゼの活性化とそれに続く転写因子群の活性化、酸化ストレス応答因子の発現誘導などの異常活性化がみられた。一方で、ラット小脳由来アストロサイトは DPAA ばく露により培養液中に大量のグルタチオンを放出することが明らかとなり、DPAA による異常活性化とグルタチオンの興味深い関係が示唆された。DPAA とグルタチオンを超純水中で混合するとグルタチオン抱合された DPAA が生成されたので、それを精製しラット小脳由来アストロサイトにばく露したところもとの DPAA に比べ 100 倍以上細胞毒性が強く、アストロサイトの異常活性化を引き起こした。

#### 2) DPAA による異常活性化とグルタチオン異常分泌の細胞種 毒性相関

これまで得た知見は主にラット小脳由来アストロサイトにおけるものであるが、ここでは種々のヒト由来株化細胞(肝癌細胞 (HepG2)、グリオーマ (U251MG、T98G、1321N1)、神経芽細胞腫 (SK-N-SH、SH-SY5Y)、乳癌細胞 (MCF7)、肺癌細胞 (A549)) とラット由来グリオーマ (C6) における DPAA の影響を評価し、ラット小脳由来アストロサイトと比較した。予想通り DPAA は他の細胞にくらべアストロサイト系細胞の腫瘍であるグリオーマ (U251MG、T98G) とラット C6 において特徴的に異常活性化を引き起こした。これら種々の細胞種の DPAA ばく露時の細胞内外グルタチオンを測定したところ、結果としては DPAA による異常活性化と細胞外へのグルタチオン異常分泌との間に明確な相関は見られなかった。しかしながら、DPAA により異常活性化する細胞は、細胞内グルタチオン枯渇などのグルタチオン動態に異常を示していた。

#### 3) DPAA による異常活性化とグルタチオン代謝の関係

DPAA による細胞の異常活性化とグルタチオン産生の間にはなんらかの関係があることは疑いない。そこで、ラット小脳由来アストロサイトにおいて DPAA による異常活性化におけるグルタチオンの役割を薬理的に評価した。DPAA による異常活性化に対し細胞外への還元型グルタチオンの投与は抑制効果を示した。一方で、抗酸化物質である N アセチルシステイン(グルタチオンの材料でありその産生を促すともわれるが、アストロサイトでは否定された)は還元型グルタチオンよりも強い抑制効果を示した。また、グルタチオン合成阻害剤 BSO と細胞外グルタチオン分解酵素阻害剤(GGsTop)は部分的ではあるものの DPAA による異常活性化を抑制した。そして、グルタチオンやその抱合体化合物を排泄するトランスポーターである MRP1 阻害は DPAA による細胞死を促進した。細胞外よりも細胞内のグルタチオンが疑わしかったので BSO に加えて、グルタチオン合成酵素群の RNAi によるノックダウンによるグルタチオン合成阻害を行ったところ、同様に DPAA による異常活性化を抑制する傾向がみられた。

本研究の成果から、DPAA によるアストロサイトの異常活性化にはグルタチオンの産生が強く関与することが示唆された。今後はさらに DPAA ばく露時のグルタチオンの動態と DPAA の化学形態に注視しながら研究を展開し、この DPAA により異常活性化したアストロサイトがどのように神経細胞に影響を与えるのかを評価する事で DPAA による影響の本質の理解にせまりたい。その理解から、有機ヒ素化合物ばく露時の神経症状を予防または緩和する方法を提示したい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- Negishi T, Matsumoto M, Kobayashi Y, Kojima M, Sakaguchi F, Takahata K, Kanehira T, Arakaki R, Aoyama Y, Yoshida H, Yamada R, Sumiyoshi N, Tashiro T, Hirano S, Yoshida K, Yukawa K., *Toxicological Sciences*, 査読有, 156(2), 2017, 509-19
- Matsunaga Y, Negishi T, Hatakeyama A, Kawagoe Y, Sawano E, Tashiro T., *International Journal of Developmental Neuroscience*, 査読有, 53, 2016, 58-67
- Negishi T, Matsumoto M, Kojima M, Asai R, Kanehira T, Sakaguchi F, Takahata K, Arakaki R, Aoyama Y, Yoshida H, Yoshida K, Yukawa K, Tashiro T, Hirano S., *Toxicological Sciences*, 査読有, 150, 2016, 74-83

[学会発表](計 21 件)

- Md. Mosharaf Hossain, Takuji Ito, Takamasa Tsuzuki, Fumitaka Imaizumi, Kana Kamiya, Mitsuki Okada, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, Kazunori Yukawa, PlexinA1 is crucial for the midline crossing of cingulate axons during the formation of corpus callosum in BALB/c mice, 第 41 回 日本分子生物学会年会, 2018 年
- 根岸 隆之, 佐々木 翔斗, 都築 孝允, 湯川 和典, ジフェニルアルシン酸による培養ヒト小脳アストロサイトの異常活性化, 第 24 回 ヒ素シンポジウム, 2018 年
- M. HOSSAIN, T. ITO, T. TSUZUKI, F. IMAIZUMI, I. TAKAHASHI, T. NEGISHI, K. YUKAWA, PlexinA1 is crucial for the midline crossing of callosal axons during corpus callosum development in BALB/c mice, *Neuroscience 2018*, 2018 年"
- Takayuki Negishi, Shoto Sasaki, Shuya Wakasugi, Nobutaka Sumiyoshi, Takahiro Ishida, Rena Yamada, Syunko Kin, Yumiko Koiwa, Yuki Ohishi, Ayumi Takagi, Tomoka Shibata, Ai Kitabepu, Yuho Kondo, Maho Takano, Mai Nakajima, Kazunori Yukawa, ジフェニルアルシン酸によるヒト小脳由来アストロサイトの活性化と細胞種-毒性相関, 第 41 回 日本神経科学大会, 2018 年"
- 根岸 隆之, 佐々木 翔斗, 大石 悠稀, 柴田 朋香, 高木 梓弓, 石田 貴啓, 金 俊孝, 小岩 優美子, 住吉 信尚, 山田 怜奈, 北別府 愛, 近藤 優帆, 高野 真帆, 中嶋 真唯, 若杉 周弥, 湯川 和典, 培養ラット小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による細胞増殖亢進・細胞死誘導とチオール基含有化合物, 第 45 回 日本毒性学会学術年会, 2018 年
- 佐々木翔斗, 大石悠稀, 住吉信尚, 石田貴啓, 都築孝允, 湯川和典, 根岸隆之, ジフェニルアルシン酸ばく露によるヒト小脳由来アストロサイトの異常活性化: 細胞増殖亢進と MAP キナーゼ活性化, 第 64 回 日本薬学会東海支部大会, 2018 年
- 大石悠稀, 佐々木翔斗, 住吉信尚, 石田貴啓, 都築孝允, 湯川和典, 根岸隆之, アストロサイト系細胞におけるジフェニルアルシン酸によるグルタチオン分泌亢進とその意義, 第 64 回 日本薬学会東海支部大会, 2018 年
- 岩佐愛, 今西航, 西田充希, 竹下真由, 都築孝允, 根岸隆之, 湯川和典, PlexinA1 遺伝子欠損マウスにおける統合失調症様行動, 第 64 回 日本薬学会東海支部大会, 2018 年
- Mohammad Mosharaf Hossain, Fumitaka Imaizumi, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, Kazunori Yukawa, Mapping the localization of semaphorins and semaphorin binding partners in the mouse cortical midline during corpus callosum development, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017, 2017 年
- 湯川和典, 池谷明寛, 今泉文孝, Mohammad Mosharaf Hossain, Laboni Mst-Sharifa-Jahan, Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan, 根岸隆之, 脳梁発達期の帯状回パイオニア軸索ガイダンスにおける plexinA1 の役割, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会

ConBio2017、2017年

Kazunori Yukawa, Mohammad Mosharaf Hossain, Laboni Mst-Sharifa-Jahan, Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan, Ikuko Takahashi, Takayuki Negishi, The role of plexin-A1 receptor in the guidance of cingulate pioneering axons during the corpus callosum development, Neuroscience 2017、2017年

根岸 隆之、松本 真実、山田 怜奈、石田 貴啓、住吉 信尚、小岩 優美子、金 俊孝、佐々木 翔斗、高木 梓弓、柴田 朋香、大石 悠稀、吉田 謙二、湯川 和典、ジフェニルアルシン酸によるグリア細胞特異的細胞増殖亢進作用、第40回 日本神経科学大会、2017年

根岸 隆之、松本 真実、小岩 優美子、石田 貴啓、住吉 信尚、山田 怜奈、金 俊孝、佐々木 翔斗、高木 梓弓、柴田 朋香、大石 悠稀、吉田 謙二、湯川 和典、ラット小脳由来アストロサイトのジフェニルアルシン酸、フェニルメチルアルシン酸、およびジメチルアルシン酸による異常活性化における構造毒性相関、第44回 日本毒性学会学術年会、2017年

Yukawa K, Ito T, Hossain MM, Negishi T, Yoshida K, Plexin-A1 is crucial for developmental neuronal death in cerebellum, Neuroscience 2016、2016年

Md. Mosharaf Hossain, Takuji Ito, Takayuki Negishi, Kenji Yoshida, Kazunori Yukawa, Plexin-A1 is crucial for developmental neuronal death in cerebellum、第7回名古屋・南京・瀋陽薬学学術シンポジウム、2016年

根岸 隆之、松本 真実、浅井 椋大、阪口 文香、高畑 和明、金平 朋子、小嶋 幹也、青山 洋平、新垣 梨奈、吉田 光、田代 朋子、平野 靖史郎、吉田 謙二、湯川 和典、小脳由来培養アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸によるMAPキナーゼの活性化、第39回 日本神経科学大会、2016年

松本真実、青山洋平、新垣梨奈、吉田 光、吉田謙二、湯川和典、根岸隆之、ジフェニルアルシン酸ばく露による小脳由来アストロサイトの活性化における活性酸素種の関与、第62回 日本薬学会東海支部大会、2016年

蔦村郁生、小口由夏、下村侑司、田中彩紗、成田裕太、吉田朱里、杉浦和也、吉田朋代、根岸隆之、湯川和典、吉田謙二、I-Ag7/ペプチド複合体を用いた脾臓反応性CD4+ T細胞の検出、第62回 日本薬学会東海支部大会、2016年

田中彩紗、小口由夏、下村侑司、成田裕太、吉田朱里、蔦村郁生、根岸隆之、湯川和典、吉田謙二、NODマウスに存在するI-Ag7/ペプチド複合体反応性CD4+ T細胞の解析、第62回 日本薬学会東海支部大会、2016年

根岸 隆之、松本 真実、金平 朋子、吉田 光、新垣 梨奈、青山 洋平、浅井 椋大、小嶋 幹也、阪口 文香、高畑 和明、田代 朋子、平野 靖史郎、吉田 謙二、湯川 和典、ジフェニルアルシン酸によるラット小脳由来アストロサイトの異常活性化とN-アセチル-L-システインの効果、第43回 日本毒性学会学術年会、2016年

②成田 裕太、小口 由夏、下村 侑司、田中 彩紗、吉田 朱里、根岸 隆之、湯川 和典、吉田 謙二、MHC/ペプチド複合体を用いたNODマウスに存在する脾臓反応性CD4+T細胞クローン様の細胞集団の検出、第59回 日本糖尿病学会年次学術集会、2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 弥生

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Yayoi)

所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所

部局名：環境リスク・健康研究センター

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：00391102

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。