

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15488

研究課題名(和文)メチル水銀によって細胞外に放出される細胞増殖阻害因子の解明

研究課題名(英文)Cytostatic factor that released from methylmercury exposed cells

研究代表者

外山 喬士(Takashi, Toyama)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50720918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、メチル水銀によって細胞から培地中に放出される細胞増殖抑制因子を分画しLC/MSで分析したところ、4-hydroperoxynonenalが同定された。4-hydroxynonenalとメチル水銀で細胞を同時に処理すると、メチル水銀の細胞増殖抑制作用が顕著に増加したことから、本因子はメチル水銀により細胞外に放出される細胞増殖抑制因子の一つであることが明らかとなった。また、本因子はミトコンドリアの過活性化に伴う活性酸素種産生増加と、glutathione peroxidase阻害の2つの経路を介して産生が亢進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人は世界的にも魚介類の摂取が多いためメチル水銀曝露量が高く、そのリスクは身近な食品衛生上の問題であるが、その毒性発現機構は不明である。これまでは、メチル水銀が直接細胞内の分子に作用することで、毒性を発揮するという考えが主流であったが、本研究結果からメチル水銀により放出細胞外に放出された4-HNEが、メチル水銀による細胞増殖抑制作用を増加させる因子として示唆された。そのため本研究はメチル水銀の全く新しい毒性発現機構の一端が示したという点で学術的に意義深い。また、本研究は将来的にメチル水銀感受性の差のバイオマーカーとして4-HNEを利用することで、社会に役立つ研究へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, 4-hydroperoxynonenal was identified as a candidate of cytostatic factor that released from neuronal stem cells by methylmercury. When the cells were treated with both 4-hydroxynonenal and methylmercury, effect of cell growth inhibition by methylmercury was significantly increased by co-treatment of 4-hydroxynonenal. Therefore, this factor can be a cytostatic factor that released from the cell exposed to methylmercury. In addition, it was suggested that the production of this factor is enhanced through two pathways. One is increased reactive oxygen species production associated with mitochondrial over-activation by methylmercury and the other is inhibition of glutathione peroxidase by covalent modification of Cys or seleno Cys that responsible for its activity.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 細胞外放出因子 酸化ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は環境中に普遍的に存在する環境化学物質であり、近年は妊婦の魚介類を介したメチル水銀の過剰摂取による胎児の脳の発達障害が世界的な社会問題となっている。この問題に対応するために、2013年には国連委員会において「水俣条約」が採択され、水銀の採掘・利用・排出等が国際的に制限されることになった。しかし、メチル水銀毒性の発現機構は水俣病の発症から半世紀が経過した現在も不明のままであり、解明のための糸口さえほとんど得られていない。近年、様々な刺激によって細胞外に放出されるサイトカイン類やヌクレオチド等に起因する細胞間のクロストークが注目されている。申請者は、メチル水銀により細胞外に放出される因子の有無を明らかにするため、マウス培養神経幹細胞及びヒト胎児腎細胞をモデルに用いたシンプルな実験系を構築した。その結果、メチル水銀で処理した細胞の培養液が強力な細胞増殖抑制作用を示すことを見出した(図1)。大変興味深い事に、本培地中から蛋白質-ペプチド成分を除去しても細胞増殖抑制作用は失われず、しかも HPLC 及び CE/MS による検討によって当該活性を示す物質がヌクレオチド類、脂肪酸、ポリアミン類等、既知の細胞間情報伝達物質ではないことも示された。メチル水銀以外の数種類の化学物質についてと同様の検討をしても、培地に細胞増殖抑制作用は認められないことから、神経幹細胞はメチル水銀特異的に細胞増殖抑制因子を放出すると考えられた。

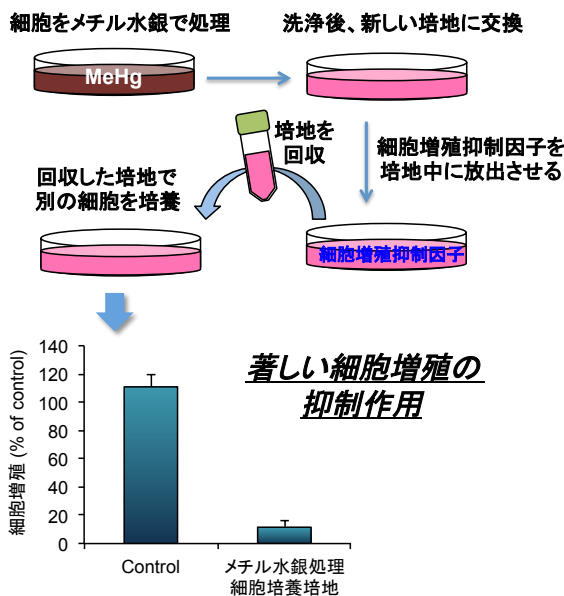
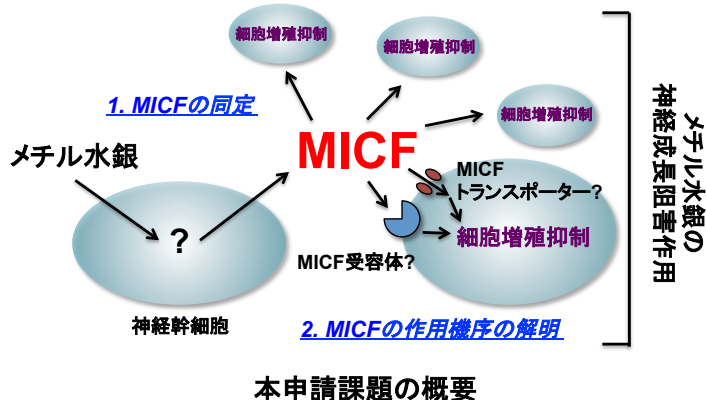


図1. メチル水銀により細胞外に放出される細胞増殖抑制因子が存在する

### 2. 研究の目的と意義

本研究では、メチル水銀で処理した培養細胞外に放出される細胞増殖抑制因子 (MICF) を同定し、その細胞増殖抑制機構の解明を目指した。本研究の概要を図に示す。本申請研究は、これまで予想もされなかった全く新しいメチル水銀毒性発現機構を解明するものである。また本研究によって新規の細胞間情報伝達物質が同定されれば、基礎生物学分野、創薬分野等の基盤研究へも大きな波及効果を与え得るだろう。



本申請課題の概要

### 3. 研究の方法

メチル水銀で神経幹細胞を処理し、培地上清に放出された細胞増殖抑制因子について、ODSカラムにより粗精製後ゲルろ過カラムにより分画を行った。本画分の細胞増殖抑制作用を検討し、最も抑制作用が認められた画分に対し、LC/MSを用いてメタボローム解析を行った。そこで同定された当該因子で細胞を処理することで、細胞増殖阻害活性を評価した。当該因子の産生には酸化ストレスが関与することが知られていたため、その産生機構については、活性酸素指示薬である Mito-Sox や H2DCFDA を用いて評価した。

### 4. 研究成果

まず、メチル水銀で処理したマウス神経幹細胞を洗浄後、HBSSで培養することでMICFを溶出させ、本溶液をODSカラムに通し、フロースルー画分をゲルろ過により分離した結果、分子量200-300付近の画分に細胞増殖抑制作用が認められた。そこで、本画分をLC/MSにより分析し、データベース解析した結果、メチル水銀で増加した6種類の化合物が検出され、その中で哺乳動物の細胞から産生される物質として、4-hydroperoxynonenal (4-HPNE) が同定された。

4-HPNE は脂質の過酸化に伴い産生される分子であり、細胞内で 4-hydroxynonenal (4-HNE) となり、蛋白質への共有結合を介して細胞傷害に関与することが知られている。そこで、細胞に 4-HNE を処理するとメチル水銀の毒性が有意に増加したことから、MICF の一部である可能性が考えられた。4-HNE は酸化ストレスに伴って産生が増加するため、メチル水銀で処理した神経幹細胞からの活性酸素種 (ROS) 産生を測定したところ、ミトコンドリアから ROS 産生 (Mito-SOX Red で測定) が顕著に増加することが明らかとなった。ミトコンドリア膜電位を指示薬である JC-1 で測定したところ、メチル水銀の濃度依存的に膜電位が増加した。このことから、メチル水銀はミトコンドリアの過活性化を介して ROS 産生を増加させ、下流での 4-HNE を介した細胞増殖抑制作用を示すことが示唆された。そこで次に、ミトコンドリアからの ROS 産生阻害剤である Mito-TEMPO で神経幹細胞を前処理し、メチル水銀で処理したところ、その細胞増殖抑制作用は低下した。また、メチル水銀投与マウスの血液中で脂質酸化 (4-HNE 産生) を抑制する glutathione peroxidase (GPx) にメチル水銀が直接結合し、その酵素活性を低下させることが明らかとなった。以上より、メチル水銀はミトコンドリアからの ROS 産生と脂質過酸化抑制の阻害の二重の作用によって、4-HNE 産生を増加させ、メチル水銀の細胞増殖抑制作用を増強させることが示唆された。

日本人は世界的にも魚介類の摂取が多いためメチル水銀曝露量が高く、そのリスクは身近な食品衛生上の問題であるが、その毒性発現機構は不明である。これまでは、メチル水銀が直接細胞内の分子に作用することで、毒性を発揮するという考えが主流であったが、本研究結果からメチル水銀により放出細胞外に放出された 4-HNE が、メチル水銀による細胞増殖抑制作用を増加させる因子として示唆された。そのため本研究はメチル水銀の全く新しい毒性発現機構の一端が示したという点で学術的に意義深い。また、本研究は将来的にメチル水銀感受性の差のバイオマーカーとして 4-HNE を利用することで、社会に役立つ研究へと発展する可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Nishimura A, Shimauchi T, Tanaka T, Shimoda K, Toyama T, Kitajima N, Ishikawa T, Shindo N, Numaga-Tomita T, Yasuda S, Sato Y, Kuwahara K, Kumagai Y, Akaike T, Ide T, Ojida A, Mori Y, Nishida M. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence. 2018. 11 (556). Science Signaling. 査読あり. 10.1126/scisignal.aat5185.
2. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-Dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. 2017, 30 (9), 1673-1679. Chemical Research in Toxicology. 査読あり. 10.1021/acs.chemrestox.7b00120.
3. Takahashi T, Wang Y, Toyama T, Kim M. S., Kuge S., Hwang G. W., Naganuma A. Small interfering RNA-mediated knockdown of the transcription factor TCF3 enhances sensitivity to methylmercury in mouse neural stem cells. 2017, 4 (2), 41-43. Fundamental Toxicological Sciences. 査読あり. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/fts/4/2/4\\_41/\\_article/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/fts/4/2/4_41/_article/-char/ja).
4. Oda S, Numaga-Tomita T, Kitajima N, Toyama T, Harada E, Shimauchi T, Nishimura A, Ishikawa T, Kumagai Y, Birnbaumer L, Nishida M. TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex leading to

attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice. 2017, 4 (7). Scientific Report. 査読あり.  
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-07903-4>.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Toyama T, Hoshi T, Naganuma A and Hwang G.W.. Mechanisms involved in the induction of TNF- $\alpha$  expression by methylmercury in mouse brain. Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo. 2019.

2. Toyama T, Hwang G.W., Naganuma A. Identification of the Cytotoxicity-inducing Factors that are Released from Cells by Methylmercury. Society of Toxicology 57th Annual Meeting and ToxExpo. 2018.

3. Toyama T, Naganuma A and Hwang G.W. Identification of the cytotoxic factor released from cells treated with methylmercury. The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens. 2017.

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。