

研究種目： 基盤研究（B）  
研究期間： 2006 年度～2009 年度  
課題番号： 18390042  
研究課題名（和文） メチル水銀の神経毒性発現における標的としてのプロテオグリカン代謝異常  
研究課題名（英文） Abnormal proteoglycan metabolism as a target of neurotoxicity of methylmercury  
研究代表者  
鍛冶 利幸（KAJI TOSHIYUKI）  
北陸大学・薬学部・教授  
研究者番号：90204388

研究分野： 環境健康学  
科研費の分科・細目： 薬学・環境系薬学  
キーワード： メチル水銀，血管，内皮細胞，周皮細胞，脳，毒性

### 1. 研究計画の概要

水俣病の公式発見から 50 年以上が経過した今になってもメチル水銀の毒性発現機構はほとんど不明のままである。特に、大脳において脳溝周囲に障害が限局する機構と、小脳において顆粒細胞が特異的に傷害される機構がよく分かっていない。プロテオグリカンは細胞外マトリックスの構成成分として細胞増殖因子等による細胞の機能調節に重要に関与している複合糖質である。本研究では、脳微小血管構成細胞のプロテオグリカン代謝とそれが関与する生体システムがメチル水銀の毒性発現機構に寄与することを明らかにする。

### 2. 研究の進捗状況

メチル水銀による大脳障害が脳溝周囲に限局して発生する pathogenesis として、衛藤の“浮腫仮説”が有力である。すなわち、メチル水銀は浮腫を発生させ、その結果生じる循環障害が形態的に脳溝周囲で起こりやすいのでそこに障害が限局するというものである。脳浮腫発生の機構としては、脳微小血管構成細胞の非特異的な傷害（cellular brain edema）および脳微小血管構成細胞の機能異常による血管の透過性の亢進（vasogenic brain edema）が知られている。そこで、ヒト脳微小血管内皮および周皮細胞の培養系を用いて、それらの分子機構を検討し、以下の結果を得た。

（1）メチル水銀は内皮細胞に対して細胞傷害性を示さないが、人為的に傷害した内皮細胞層の修復を強く阻害した。この阻害は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの大型分子種パールカンが関与する FGF-2 システムの機能

低下によるものであったが、パールカンの合成阻害ではなく、FGF-2 の発現低下に起因することが明らかになった。

（2）メチル水銀に曝露した周皮細胞では血管透過性因子 VEGF-A の発現が顕著に上昇していた。一方、内皮細胞では VEGF-A の機能受容体 VEGFR2 の発現が上昇していた。同時にデコイ受容体 VEGFR1 の発現も上昇していたが、VEGFR1 に特異的に結合して VEGF-A の結合を妨げる PlGF の発現も上昇していた。このような自己分泌型 / 傍分泌型 VEGF システムの異常は結果として、内皮細胞に対する VEGF-A の活性を高め、血管透過性を亢進させるものと考えられる。

（3）メチル水銀中毒ラットの脳について病理組織学的な検討を行い、メチル水銀が顆粒細胞を傷害し、それと脳微小血管の透過性亢進が引き金となって細胞傷害性 T-リンパ球が顆粒細胞層に浸潤しアポトーシスを誘発し、さらにマクロファージが浸潤して顆粒細胞を傷害するという炎症性変化が顆粒細胞の急速・大規模な傷害の pathogenesis であるとする“炎症仮説”を提案することに成功した。このとき、脳特異的プロテオグリカンの代謝には影響は認められなかった。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。  
（理由）メチル水銀の毒性発現にプロテオグリカン代謝が関与しているとの作業仮説に立脚して開始した本研究は、メチル水銀によるプロテオグリカンが関与する細胞増殖因子の活性発現異常の分子機構解明へと発展し、大脳障害の“浮腫仮説”を分子レベルで説明することに成功しつつある。さらに、小

脳障害については、新たに“炎症仮説”の提唱につながった。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) メチル水銀によるプロテオグリカン代謝異常について、さらに詳細な生化学的分子生物学的解析を行い、またその異常の意義を明らかにする。

(2) “炎症仮説”について、その分子基盤をプロテオグリカン代謝が関与する生体システムに注目しながら解明していく。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 12 件)

Hirooka, T., Fujiwara, Y., Inoue, S., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Masahiko, S., Yasutake, A., Eto, K. and Kaji, T. Suppression of fibroblast growth factor-2 expression: Possible mechanism underlying the methylmercury-induced inhibition of the repair of wounded monolayers of cultured human brain microvascular endothelial cells. *J. Toxicol. Sci.*, **34**: 433-439 (2009).

Shinkai, Y., Sumi, D., Toyama, T., Kaji, T. and Kumagai, Y. Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**: 232-236 (2009).

Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Hirooka, T., Terada, N., Satoh, M. and Kaji, T. Arsenite but not arsenate inhibits general proteoglycan synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J. Toxicol. Sci.*, **33**: 487-492 (2008).

Hirooka, T., Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A. and Kaji, T. Methylmercury retards the repair of wounded monolayer of human brain microvascular endothelial cells by inhibiting their proliferation without nonspecific cell damage. *J. Health Sci.*, **53**: 450-456 (2007).

Kaji, T., Yamamoto, C., Oh-i, M., Fujiwara, Y., Yamazaki, Y., Morita, T., Plaas, A. H. and Wight, T. N. The vascular endothelial growth factor VEGF165 induces perlecan synthesis via VEGF receptor-2 in cultured human brain microvascular endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**: 1465-1474 (2006).

[学会発表](計 71 件)

廣岡孝志, 杜可, 山本千夏, 安武章, 衛藤光明, 勝田省吾, 鍛冶利幸. メチル水銀による小脳障害のメカニズムに関する新しい仮説. 第36回日本トキシコロジー学

会学術年会(2009年7月盛岡)

杜可, 廣岡孝志, 山本千夏, 安武章, 勝田省吾, 鍛冶利幸. メチル水銀中毒ラットの脳小脳顆粒細胞層における炎症性変化を伴った退行性変化. 日本薬学会第129年会(2009年3月京都)

廣岡孝志, 山本千夏, 石井明彦, 石郷岡美緒, 新開泰弘, 安武章, 鍛冶利幸. VEGFの自己分泌/傍分泌型調節システムは脳微小血管組織におけるメチル水銀毒性の標的である. フォーラム2008 衛生薬学・環境トキシコロジー(2008年10月熊本)  
田中満崇, 廣岡孝志, 藤原泰之, 井上頌子, 山本千夏, 新開泰弘, 安武章, 鍛冶利幸. メチル水銀はヒト脳微小血管周皮細胞においてシンデカン-4の発現を誘導する. 日本薬学会第128年会(2008年3月横浜)  
廣岡孝志, 藤原泰之, 山本千夏, 井上頌子, 南有香, 新開泰弘, 安武章, 鍛冶利幸. メチル水銀は傷害した培養脳微小血管内皮細胞層の修復をFGF-2システムの抑制を通じて阻害する. メタロチオネインおよびメタロバイオサイエンス研究会(2007年9月徳島)

廣岡孝志, 藤原泰之, 山本千夏, 安武章, 鍛冶利幸. ヒト脳微小血管内皮細胞の維持に対するメチル水銀の毒性. 第8回Pharmaco-Hematology シンポジウム.(2007年6月金沢)

[その他]

新聞掲載:(a)2008年12月25日付北國新聞,(b)2009年7月26日付北日本新聞  
アウトリーチ活動:(a)北國新聞生きがい支援事業第2回北陸大学プログラム「長寿県いしかわを目指して~21世紀の健康と医療~」(北陸大学,北國新聞社主催)において,「環境と健康健康を脅かす環境問題」と題して講演(2008年11月29日金沢文化ホール).(b)北國新聞生きがい支援事業第3回北陸大学プログラム「長寿県いしかわを目指して~21世紀の健康と医療~」パネルディスカッション(北陸大学,北國新聞社主催)において,パネラーとして講演(2008年12月20日金沢文化ホール).(c)北陸大学DANTOTSU薬立・健康セミナー2009 in TOYAMA(北陸大学主催,北日本新聞社協賛)において,「環境と健康環境と健康の接点」と題して講演(2009年7月11日北日本新聞ホール).  
ホームページ情報:(a)北陸大学学術フロンティア事業ホームページ. URL: <http://www.hokuriku-u.ac.jp/frontier>  
(b)北陸大学薬学部環境健康学教室ホームページ. URL: <http://www.hokuriku-u.ac.jp/yakugaku/kankyo2/>