

平成 22 年 3 月 31 日現在

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（Toshiyuki Kaji）  
 北陸大学・薬学部・教授  
 研究者番号：90204388

研究成果の概要（和文）：メチル水銀は魚介類に多く蓄積している有機金属である。プロテオグリカンはコアタンパク質にグリコサミノグリカン糖鎖を結合した複合糖質であり、細胞機能を多様に調節する分子である。本研究はメチル水銀の血管毒性に、プロテオグリカンが関与する生体システムである FGF-2 及び VEGF システムが重要であることを明らかにした。さらに、メチル水銀中毒ラットの小脳の組織学的観察から、メチル水銀による小脳障害の病因論として、炎症性の細胞が関与するという“炎症仮説”を提案した。

研究成果の概要（英文）：Methylmercury is an organic metal that is contained in fish at high levels. Proteoglycans are macromolecules that consist of a core protein and glycosaminoglycan side chains. In this study, it was found that biological systems regulated by proteoglycans, including FGF-2 and VEGF systems, are important for the vascular toxicity of methylmercury. In addition, we proposed “Inflammatory hypothesis” as the pathogenesis of cerebellar damage caused by methylmercury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
平成 19 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
平成 20 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
平成 21 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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. 研究開始当初の背景

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、大脳において深い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。

大脳における部位特異的な障害の発生メカニズムはまったく不明であるが、病因論としては水俣病患者やメチル水銀曝露動物の脳の病理組織学的観察から提唱されている

“浮腫仮説”が有力である。これは、メチル水銀は脳組織に浮腫を発生させ、深い脳溝周辺では組織の構造上、浮腫による循環障害が起きやすいために障害も起こりやすいとする説である。

浮腫の発生メカニズムは単純ではないが、脳微小血管の機能障害に基づく血管透過性の亢進が重要な要因として想定される。脳微小血管は内皮細胞と周皮細胞によって校正されているが、その機能調節にはプロテオグリカンと呼ばれる複合糖質が重要に関与している。

そこで、脳微小血管内皮/周皮細胞においてプロテオグリカンが関与する生体システムがメチル水銀の標的となっているのではないかと着想した。その前提として、脳微小血管内皮/周皮細胞に対するメチル水銀の傷害性についても検討が必要であった。さらに、メチル水銀の血管毒性が小脳においてメチル水銀が顆粒細胞特異的に傷害性を発揮するメカニズムに関与する可能性を示し得ると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の培養系を用いて、メチル水銀に対する感受性とそれに関わる特性を検討し、メチル水銀による機能障害の様式とそのメカニズムに検討を加え、さらにそれらの検討結果をふまえて小脳障害についてメチル水銀中毒ラット小脳病理組織学的検討から顆粒細胞特異的な傷害メカニズムの仮説を得ることである。

## 3. 研究の方法

ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞を培養し、メチル水銀で処理した。処理後、形態学的観察および培地への乳酸脱水素酵素の逸脱（細胞死の指標）によって細胞への傷害性を評価する。内皮細胞をスパースに播種し、増殖能を細胞数および酸不溶性画分への<sup>3</sup>H]チミジンの取り込みで評価した。増殖に関わる因子として、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だけでなく、FGF-2およびFGFレセプターの発現についても検討した。内皮細胞をコンフルエントまで培養し、一部を人為的に傷害し、メチル水銀存在下での修復を形態学的に観察した。メチル水銀で処理した内皮/周皮細胞におけるVEGF関連タンパク質の発現をReal time RT-PCRおよびWestern blot分析で調べた。別に、メチル水銀投与によって後肢交差を起こしたラット小脳について、組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)メチル水銀の細胞傷害性に対して、内皮細胞は細胞密度に無関係に抵抗性を示すが、周皮細胞は細胞密度が低いときに高い感受性を示すことが分かった。内皮細胞では、メチル水銀を細胞内に輸送するLAT-1タンパク質の発現レベルが高い低細胞密度でメチル水銀が細胞内に蓄積しやすいが、メチル水銀の防御系因子（グルタチオンおよびメタロチオネイン）のレベルも高く、結果として細胞密度に無関係に抵抗性を示すことが示された。一方、細胞密度が低い周皮細胞では、LAT-1タンパク質の発現が高く、しかもその発現はメチル水銀によってさらに高くなり、そのためにメチル水銀が細胞内に蓄積しやすくなる。防御系因子のレベルは細胞密度による違いはなく、LAT-1の発現レベルがメチル水銀に対する感受性を決定することが示された。

(2)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。

(3)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PIGF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。VEGFに曝露した内皮細胞ではパールカンの合成が誘導されることも明らかにした。

(4)メチル水銀に曝露した内皮細胞および周皮細胞の細胞外マトリックスではグリコサミノグリカンのひとつであるヒアルロナンが有意に増加することを示した。そのメカニズムとして、内皮細胞においてはUDP-グルコースをヒアルロナン糖鎖のプレカーサーであるUDP-グルクロン酸に変換するUDP-グルコースデヒドロゲナーゼの発現上昇が、周皮細胞においてはヒアルロナン合成酵素-2の発現上昇が、それぞれ重要であることを解明した。

(5)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（ニューログリカンC）の代謝には影響は認められなかった。

以上の研究成果は、メチル水銀中毒における大脳障害の部位特異性と小脳障害の顆粒細胞特異性の両方に、プロテオグリカン—FGF-2 システム—VEGF システム—血管透過性の調節—結果としての細胞傷害機構から構成されるメチル水銀の血管毒性が関与していることを示唆している。このような見地は、メチル水銀の毒性研究に新たな視点を与えるだけでなく、永く不明であったメチル水銀中毒における大脳障害の部位特異性と小脳障害の顆粒細胞特異性の分子基盤の解明の扉を開くものである、したがって、今後はメチル水銀の血管毒性の詳細な分子機構を、プロテオグリカンの代謝異常を念頭に置きながら解明していく研究が重要になると思われる。

#### 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 20 件)

- . Hirooka, T., Fujiwara, Y., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A., Satoh, M., Eto, K. and Kaji, T. (2010) Resistance of human brain microvascular endothelial cells in culture to methylmercury: Cell-density-dependent defense mechanisms. *J. Toxicol. Sci.*, in press. 査読有
- . Shinkai, Y., Yamamoto, C., and Kaji, T. (2010) Lead induces the expression of endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and GRP94 in vascular endothelial cells via the JNK-AP-1 pathway. *Toxicol. Sci.*, **114**: 378-386. 査読有
- . Hirooka, T., Fujiwara, Y., Minami, Y., Ishii, A., Ishigooka, M., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Satoh, M., Yasutake, A., Eto, K. and Kaji, T. (2010) Cell-density-dependent methylmercury susceptibility of cultured human brain microvascular pericytes. *Toxicol. In Vitro*, **24**: 835-841. 査読有
- . Hirooka, T., Fujiwara, Y., Inoue, S., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Masahiko, S., Yasutake, A., Eto, K. and Kaji, T. (2009) 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. 査読有

- . 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. (2009) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**: 232-236. 査読有
- . Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Hirooka, T., Terada, N., Satoh, M. and Kaji, T. (2008) Arsenite but not arsenate inhibits general proteoglycan synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J. Toxicol. Sci.*, **33**: 487-492. 査読有
- . Hirooka, T., Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A. and Kaji, T. (2007) 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. 査読有
- . Kaji, T., Yamamoto, C., Oh-i, M., Fujiwara, Y., Yamazaki, Y., Morita, T., Plaas, A. H. and Wight, T. N. (2006) 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. 査読有

[学会発表](計 72 件)

(\*発表者)

- \*廣岡孝志, 新開泰弘, 山本千夏, 安武章, 衛藤光明, 鍛冶利幸. メチル水銀は脳浮腫形成に關与する脳血管組織の VEGF システムを活性化する. 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月岡山)
- \*姫妹琦, 廣岡孝志, 山本千夏, 安武章, 衛藤光明, 鍛冶利幸. メチル水銀のヒト脳微小血管内皮細胞への傷害性発現は低酸素環境下において増強される. 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月岡山)
- \*廣岡孝志, 山本千夏, 安武章, 衛藤光明, 鍛冶利幸. メチル水銀は培養ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞のヒアルロン酸合成を促進する. フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009 年 11 月沖縄)
- \*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)
- \*廣岡孝志, 鍛冶利幸. メチル水銀の部位特異的な中枢神経障害発現要因としての

血管毒性 .シンポジウム :若手が切り開く  
Molecular Toxicology 4 ~ 有害金属類の毒  
性発現と防御を担う分子標的と生体応答  
システム ~ .日本薬学会第 129 年会 ( 2009  
年 3 月京都 )

\*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  
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 )  
杜 可 ,山本千夏 ,廣岡孝志 ,安武 章 ,勝  
田省吾 ,鍛冶利幸 .メチル水銀投与ラット  
脳の病理組織学的変化 : 小脳障害のメカニ  
ズムに関する新しい仮説 .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 )

\*廣岡孝志 藤原泰之 ,南 有香 ,山本千夏 ,  
新開泰弘 ,安武 章 ,鍛冶利幸 .ヒト脳微  
小血管周皮細胞に対するメチル水銀の細  
胞密度依存的な傷害性 .日本薬学会第 128  
年会 ( 2008 年 3 月横浜 )

\*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 ,新開泰弘 ,安武 章 ,鍛冶利幸 .メチ  
ル水銀による傷害内皮細胞層の修復阻  
害 : FGF-2 系および VEGF 系は関与する  
か ? フォーラム 2007 衛生薬学・環境トキ  
シコロジー ( 2007 年 11 月大阪 )

\*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  
Pharmac-Hematology シンポジウム .  
( 2007 年 6 月金沢 )

[ その他 ]

ホームページ等

北陸大学薬学部環境健康学教室ホームペ  
ージ :

<http://www.hokuriku-u.ac.jp/yakugaku/kankyos2/i>

index.html

北陸大学学術フロンティア研究組織ホーム  
ページ :

<http://www.hokuriku-u.ac.jp/frontier/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鍛冶 利幸 ( 北陸大学・薬学部・教授 )

研究者番号 : 90204388

### (2)研究分担者

山本 千夏 ( 北陸大学・薬学部・准教授 )

研究者番号 : 70230571

藤原 泰之 ( 愛知学院大学・薬学部・准教授 )

研究者番号 : 40247482

周尾 卓也 ( 北陸大学・薬学部・助教 )

研究者番号 : 90399006

廣岡 孝志 ( 北陸大学・薬学部・研究員 )

研究者番号 : 50397519

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :