

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790110

研究課題名（和文）メチル水銀の神経毒性発現に關与する脳浮腫発生の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying brain edema in neuropathy caused by methylmercury

研究代表者

廣岡 孝志（HIROOKA TAKASHI）

北陸大学・薬学部・研究員

研究者番号：50397519

研究成果の概要：メチル水銀中毒（水俣病）の脳傷害の局在性は、脳浮腫形成とそれによる二次的な循環障害に起因するとされる。しかしながら、メチル水銀による脳浮腫形成の分子機構は不明であった。申請者は、メチル水銀が、脳微小血管を構成する内皮および周皮細胞に対して特徴的な毒性を発現することを明らかにした。この結果は、メチル水銀が脳微小血管構成細胞の機能障害を介して脳浮腫を発生させる可能性を示すものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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，脳浮腫，脳微小血管内皮細胞，脳微小血管周皮細胞，細胞傷害性，血管透過性，VEGF，FGF-2

## 1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は、我が国で最も代表的な公害健康被害である水俣病の原因汚染物質である。メチル水銀の健康影響を正確に理解するためには、その毒性発現機構の解明が必要不可欠である。しかしながら、水俣病の発症確認から50年以上経過した現在においても、そ

の詳細はほとんど不明である。

メチル水銀中毒（水俣病）の脳の病理形態学的な特徴は、その毒性が中枢神経系において特異的に高く発現すること、および成人と胎児性ではメチル水銀による脳組織の傷害部位とその程度が大きく異なることである。すなわち、胎児では中枢神経全体が傷害される

のに対し、成人では小脳の顆粒細胞層および大脳皮質の深い脳溝周辺組織（鳥距溝，外側溝および中心溝周辺の組織）が強く傷害される。このような部位特異的な神経障害の発生機序として，衛藤は「浮腫仮説」を提唱している。それによると，メチル水銀曝露の初期病変として脳浮腫が発生し，それによって深い脳溝周辺では圧迫が生じるために循環障害が顕著になり，結果的に部位特異的な神経細胞の傷害が発生するという。この仮説は大脳におけるメチル水銀の部位特異的な傷害性を合理的に説明しているだけでなく，メチル水銀が脳微小血管系の浮腫発生に関わる機能障害を誘発する可能性を示唆している。したがって，メチル水銀による脳浮腫形成の分子機構の解明，言い換えればメチル水銀の血管毒性の解明は，神経毒性の発現機構の解明に重要である。

脳微小血管系は，内皮細胞とそれを取り囲む周皮細胞によって構築され，血液—脳関門とよばれる血管透過性に関するバリアーを形成している。脳浮腫は，これらの細胞群が障害を受けることにより発生する代表的な病変であり，血管の透過性が異常亢進することにより起こる血管性浮腫と毒物などにより機能障害を誘発された細胞が膨張することによって起こる細胞性浮腫に分類される。また，脳浮腫形成にはサイトカインや増殖因子など種々のタンパク質やペプチドが関与している。血管性脳浮腫の形成に関与している最も有力な分子は，血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF）とその受容体である。脳血管細胞では，VEGF-Aとその関連タンパク質であるVEGF-B，-C，-DおよびPIGFと，それらの受容体である1型受容体（VEGFR-1）および2型受容体（VEGFR-2）が発現している。脳浮腫の形成には主にVEGF-AとVEGFR-2が関与して

いると考えられている。また，最近では水特異的チャンネルタンパク質であるアクアポリンも新たな浮腫形成に関与するタンパク質として注目されている。正常な脳組織では，VEGFやアクアポリンは脳微小血管の機能の恒常性維持，例えば血管透過性や脳組織内における水とイオン濃度の恒常性などに重要な役割をしている。

メチル水銀による脳微小血管細胞への毒性発現やVEGF等の機能分子の量や局在性の変化は脳浮腫形成の分子機構の理解にきわめて重要である。しかしながら，これまでのメチル水銀毒性に関する研究は，主に神経細胞やグリア細胞におけるメチル水銀細胞毒性の標的分子やシステムの解明に注目したものであり，脳微小血管細胞の障害に基づく二次的影響としての神経細胞障害という観点からの研究はまったく行われてこなかった。

## 2．研究の目的

本研究の目的は，「浮腫仮説」の根幹である『メチル水銀による脳微小血管系の機能障害と脳浮腫の形成による循環不全ストレスにより，神経細胞のメチル水銀毒性への感受性が増加する』という作業仮説の分子基盤を検討することである。

## 3．研究の方法

### （1）ヒト脳微小血管構成細胞のメチル水銀細胞毒性に対する感受性

低細胞密度培養（Sparse）および高細胞密度培養（Dense）のヒト脳微小血管内皮細胞と周皮細胞，ならびに傷害内皮細胞層を調製し，それぞれ1，2，および3  $\mu$ Mのメチル水銀で24時間処理した。処理後，培地上清中の乳酸脱水素酵素（LDH）の活性測定とギムザ染色による細胞形態の変化の観察を行った。処

理後、細胞内に移行・蓄積したメチル水銀を高周波誘導結合プラズマ質量分析計により測定した。また、細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 量を高速液体クロマトグラフィーにより定量した。グルタチオン合成の律速段階酵素である $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ -GCS) およびメタロチオネインの発現をWestern blot分析により調べた。メチル水銀の細胞内への輸送に関与するアミノ酸トランスポーターLAT-1/2の発現量をReal-time RT-PCRおよびWestern blot分析により調べた。

#### (2) ヒト脳微小血管構成細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) および VEGF 関連タンパク質発現の解析

メチル水銀で12および24時間処理した脳微小血管内皮細胞と周皮細胞におけるFGF-2およびVEGF関連タンパク質のmRNAの発現をReal-time RT-PCRにより分析した。またタンパク質レベルにおける発現をELISAおよびWestern blot分析により調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) メチル水銀に対する感受性

まず、ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞のメチル水銀細胞毒性に対する感受性を調べた。その結果、内皮細胞では、メチル水銀の非特異的な細胞傷害性の発現による細胞の退行性変化は認められなかった。一方、周皮細胞では、Sparseな細胞層において、1  $\mu$ M以上の濃度のメチル水銀で細胞の退行性変化が観察された。しかし、Denseな周皮細胞ではそのような変化は観察されなかった。メチル水銀の非特異的な細胞傷害性発現の指標である培地中の逸脱LDHの活性も形態学的な観察と一致していた。

内皮および周皮細胞内メチル水銀蓄積量

を測定した結果、Sparseな細胞がDenseな細胞よりも高度にメチル水銀を蓄積することが明らかとなった。そこで、メチル水銀の細胞内への輸送に関与するLAT-1の発現を調べた結果、Sparseな内皮および周皮細胞において高い発現が認められた。一方、メチル水銀で処理した周皮細胞において、重金属の解毒に働くGSHの細胞内濃度およびその合成律速酵素 $\gamma$ -GCSの発現量に変化は見られなかったが、メタロチオネインについてはSparseな細胞において高い発現が観察された。周皮細胞のGSH濃度、 $\gamma$ -GCSおよびメタロチオネイン発現量は内皮細胞よりも低値を示した。一方、内皮細胞では細胞内GSH濃度、 $\gamma$ -GCSおよびメタロチオネイン発現量はSparseな細胞で高値を示した。

これらの結果は、脳微小血管周皮細胞が、メチル水銀の細胞毒性に対して細胞密度依存的に感受性を示す特有なcell typeであること、そしてこの感受性は細胞密度が低い細胞内にメチル水銀が蓄積されやすいことを示した。一方、脳微小血管内皮細胞は、メチル水銀の細胞毒性に抵抗性を示すcell typeであり、その抵抗性は細胞密度の低い細胞では $\gamma$ -GCS発現レベルが高いためにGSH量が豊富であり、同時にメタロチオネイン発現レベルも高いために細胞内にメチル水銀が高度に蓄積しても耐性を示すことによると考えられる。本研究の結果は、脳微小血管構成細胞、特に周皮細胞のメチル水銀細胞毒性に対する感受性とその決定要因を明らかにした最初の例である。

#### (2) 内皮細胞層の維持に対するメチル水銀の作用

次に、傷害内皮細胞層の修復に対するメチル水銀の作用を検討した。その結果、内皮細胞に対して非特異的な細胞傷害性を示さな

い濃度のメチル水銀は、人為的に傷害した内皮細胞層の修復を強く阻害した。傷害細胞層の修復には細胞の遊走と増殖が重要である。そこで、Sparseな内皮細胞の増殖に対するメチル水銀の作用を調べたところ、内皮細胞の増殖はメチル水銀の濃度依存的に阻害された。

傷害内皮細胞層の修復にはFGF-2システムが重要である。FGF-2はその分子内にシグナル配列を持たないことから内皮細胞が傷害もしくは生理的に死に至った場合に細胞外へと逸脱し、これが近傍の内皮細胞に作用して細胞層の修復を促すとされる。このときFGF-2はその受容体に結合して活性を発現するが、この結合はヘパラン硫酸プロテオグリカンの大型分子種であるパールカンにより加速される。そこで、Sparseおよびdenseな内皮細胞層と傷害内皮細胞層におけるFGF-2、受容体FGFR-1およびパールカンのコアタンパク質のmRNAの発現に対するメチル水銀の影響を検討したところ、メチル水銀が細胞密度および傷害の有無に関係なくFGF-2のmRNAの発現を濃度依存的に阻害することが示された。Western blot分析により、メチル水銀が内皮細胞のFGF-2の発現をタンパク質レベルにおいても低下させることが確認された。これらの結果は、内皮細胞の傷害修復を促すFGF-2システムにおいて、メチル水銀がFGF-2の発現を阻害し、内皮細胞増殖を抑制し、結果として傷害内皮細胞層の修復を阻害することを示唆している。実際、培地中にFGF-2を添加することにより、メチル水銀による傷害内皮細胞層の阻害効果は抑制された。本研究の結果は、FGF-2およびその関連タンパク質により構成される生体システムがメチル水銀の脳微小血管内皮細胞への毒性発現における標的分子（システム）であることを示唆している。

FGF-2システムは傷害内皮の修復に重要であるが、一方で恒常的な内皮細胞層維持機構としてVEGFシステムがある。そこで、脳微小血管構成細胞におけるVEGFシステム関連タンパク質の発現に対するメチル水銀の影響を検討した。その結果、メチル水銀は内皮細胞に対してはVEGFシステムにおいて主要な機能を担うVEGF-Aの機能的受容体VEGFR-2およびそのデコイ受容体VEGFR-1の発現を上昇させた。また、VEGFR-1に選択的に結合するVEGFファミリーの一員であるPlGF、およびVEGF-AのVEGFR-2への結合を促進する補助受容体Neuropilinの発現上昇も確認された。一方、周皮細胞においては、メチル水銀はVEGF-Aの発現を上昇させていた。

本研究の成果は、メチル水銀が脳微小血管を構成する内皮および周皮細胞に対して特異的な毒性を発現し、傷害後の内皮細胞層の修復、内皮細胞層を支持する周皮細胞の維持、および脳微小血管系の血管透過性などの恒常性維持を破綻させる可能性を示唆している。このようなメチル水銀の血管毒性は、FGF-2システム、グルタチオンおよびメタロチオネインから成るチオール防御システム、アミノ酸輸送システムおよびVEGFシステムなどを標的として発現されていることが明らかになった。それらのメチル水銀の毒性発現を担う生体システムが、「浮腫仮説」の分子基盤であることが示唆される。

## 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は下線)

[雑誌論文](計2件)

Takashi Hirooka, Yasuyuki Fujiwara, Shoko Inoue, Yasuhiro Shinkai, Chika Yamamoto,

Masahiko Satoh, Akira Yasutake, Komyo Eto, and Toshiyuki Kaji (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. *Journal of Toxicological Sciences*, in press. 査読有。

Takashi Hirooka, Yasuyuki Fujiwara, Chika Yamamoto, Akira Yasutake, and Toshiyuki Kaji (2007) Methylmercury retards the repair of wounded monolayer of human brain microvascular endothelial cells by inhibiting their proliferation without nonspecific cell damage. *Journal of Health Science*, 53, 450-456. 査読有。

〔学会発表〕(計6件)

廣岡 孝志, 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, 日本薬学会第129年会(シンポジウム「若手が切り開く Molecular Toxicology」), 2009年3月26日, 京都。

廣岡 孝志, 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17日, 熊本。

廣岡 孝志, 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27日, 横浜。

廣岡 孝志, メチル水銀による傷害内皮細胞層の修復阻害; FGF-2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2日, 大阪。

廣岡 孝志, 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ルバイオサイエンス研究会2007(優秀ポスター賞受賞), 2007年9月29日, 徳島。

廣岡 孝志, 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8日, 金沢。

〔その他〕

ホームページ;

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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣岡 孝志 (HIROOKA TAKASHI)

北陸大学・薬学部・研究員

研究者番号: 50397519