

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12341

研究課題名(和文) 神経分化影響を引き起こす低濃度メチル水銀曝露の標的エピゲノム分子の探索

研究課題名(英文) Study for target epigenome molecules exposed to low-concentration methylmercury that cause neuronal differentiation effects

研究代表者

栗田 尚佳 (Kurita, Hisaka)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00746315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、妊婦の魚介類摂取による低濃度メチル水銀(MeHg)の胎児神経発達への影響が懸念されている。本研究では、in vitro神経分化系を用いて神経分化における低濃度MeHgの神経影響とそのエピジェネティクスメカニズムを検討した。MeHgの神経突起伸長抑制にDNMT1とHDAC3および6の上昇を介したエピゲノム変化が重要であることを見出した。さらに、MeHgの神経突起伸長抑制と神経活動低下に関連する標的遺伝子としてNR4A1を見出し、NR4A1遺伝子プロモーター領域のヒストンH3アセチル化の低下、DNAメチル化の上昇と、それに伴うCREBのNR4A1遺伝子プロモーターへの結合阻害を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、未だ世界レベルでは、議論の余地が残っている低濃度MeHg曝露による胎児への影響について、新たな科学的知見を与えるものである。また、本成果で見出されたエピジェネティクスに注目した分子メカニズムの知見は、今後の胎盤を通過する新たな化合物の神経分化への影響の毒性影響や分子メカニズムを予測する上で、役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：Recently, there are concerns about the effect of low-concentration methylmercury (MeHg) on fetal nerve development due to the intake of fish and shellfish by pregnant women. In this study, we investigated the neurological effects of low-concentration MeHg on neural differentiation and its epigenetic mechanism using an in vitro neural differentiation system. We found that epigenome changes mediated by elevation of DNMT1 and HDAC3 and 6 are important for the suppression of neurite outgrowth in MeHg. Furthermore, we found NR4A1 as a target gene related to suppression of neurite extension and decreased neural spike activity by MeHg exposure, and MeHg decreased histone H3 acetylation in the NR4A1 gene promoter region, increased DNA methylation, and decreased CREB binding to the NR4A1 gene promoter.

研究分野：毒性学、衛生学、薬物治療学

キーワード：メチル水銀 エピジェネティクス 神経分化

1. 研究開始当初の背景

近年発達期、特に胎生期の胎内環境が成人期あるいは老人期における疾患発症リスクに関連するという、「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説」が提唱されている (Silveira, et al., 2007)。DOHaD 説における影響は胎生期に受ける環境要因によるエピジェネティクス変化によって引き起こされることが示唆されている (Gillman, 2007)。エピジェネティクスとは DNA メチル化やヒストン修飾などの DNA 配列に変化を起こさず、細胞分裂を経て伝達される遺伝子の変化やその仕組みである。また、胎生期のエピジェネティクス修飾はある程度維持され、その影響は成人期のみならず、世代を超えて影響を及ぼす可能性がある。

胎内環境を考える上で、環境化学物質も DOHaD 説におけるリスク因子となる可能性がある。その他の胎生期曝露による後発的影響が懸念されている環境化学物質としてメチル水銀 (MeHg) がある。MeHg は水俣病の原因物質である。現在日本で水俣病を引き起こすような高濃度 MeHg 汚染はないが、天然または人為起源の MeHg は依然として存在しており、MeHg が蓄積した魚介類を妊婦が摂取することによる胎児への低濃度曝露影響が示唆されている (Oken, et al., 2008)。加えてこれまでの疫学調査によって、胎児期の MeHg 曝露が記憶及び言語能力の低下に関連することが報告されている (Boucher, et al., 2014)。これまでに、培養細胞にて、すぐに細胞死を引き起こしたり、実験動物において組織的な異常が認められる高濃度 MeHg 曝露の研究は数多く成されているが、DOHaD 説を基盤とするような胎児期の低濃度 MeHg 曝露によるエピゲノム変化を介した次世代影響を示す報告はほとんどない。また、MeHg だけに限らず、特に低濃度の化学物質曝露による神経発達に及ぼす影響についての報告はほとんどないのが現状である。

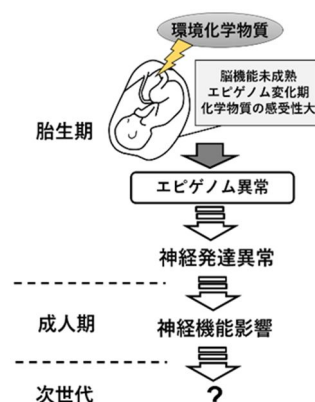


図1. DOHaDを基盤とした化学物質の神経発達への影響

2. 研究の目的

本研究では、神経突起伸長などの表現型とエピゲノム変化との因果関係、エピゲノム変化によって調節される表現型変化を引き起こす標的遺伝子群の探索、低濃度 MeHg の直接的な標的分子の探索が必要である (図2)。本研究では、これらの3つの研究項目について重点的に、これまでに低濃度 MeHg 曝露影響を見出したヒト *in vitro* 神経分化系を用いて、詳細なエピゲノムメカニズム解析を行った。

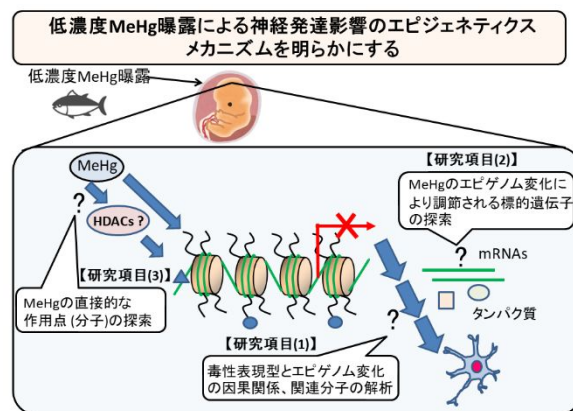


図2. 本研究の概要

3. 研究の方法

研究項目(1). 低濃度 MeHg 曝露による毒性表現型とエピゲノム変化との因果関係の証明と変動分子の探索

これまでに低濃度 MeHg 曝露により、ヒストンアセチル化低下と、DNA メチル化上昇が認められていることから、HDAC 阻害剤ならびに DNA メチル化転移酵素 (DNMTs) 阻害剤を用い、これまでに見出している毒性表現型が回復するかを検討した。この曝露条件は、ヒト胎児脳由来不死化細胞 (LUHMES 細胞) に対し、8 日間神経分化誘導し、MeHg 1 nM を 6 日間曝露し、各種解析を行った。

研究項目(2). 低濃度 MeHg 曝露エピゲノム変化により調節される毒性表現型に関する標的遺伝子の探索

(1)の MeHg 曝露したヒト細胞および胎仔マウス脳サンプルについて、網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) を行い、変動した遺伝子については qRT-PCR、ChIP assay、Bisulfite sequencing で変動を確認した。

研究項目(3). 低濃度 MeHg の直接的な作用点および標的分子の同定

低濃度 MeHg 曝露による DNMT1、HDAC6 と HDAC3 の上昇を確認している。MeHg のような親電子物質はタンパクのシステイン残基に結合し、その構造や機能を変化させる (Unoki et al., 2016)。DNMT1、HDAC6 と HDAC3 の上昇のメカニズムに注目し、その中で、DNMT1 安定化に関する、メチル化酵素である、SET7、SET8 および脱メチル化酵素である LSD1 の mRNA およびタンパクレベルでの発現変化を解析した。

4. 研究成果

研究項目(1). 低濃度 MeHg 曝露による毒性表現型とエピゲノム変化との因果関係の証明と変動分子の探索については、MeHg の神経突起伸長抑制に DNMT1 と HDAC3 および 6 の上昇を介したエピゲノム変化が重要であることを見出し、学術雑誌の Archives of Toxicology に報告した。

研究項目(2). 低濃度 MeHg 曝露エピゲノム変化により調節される毒性表現型に関する標的遺伝子の探索について、MeHg の神経突起伸長抑制と神経活動低下に関連する標的遺伝子として NR4A1 を見出し、NR4A1 遺伝子プロモーター領域のヒストン H3 アセチル化の低下、DNA メチル化の上昇と、それに伴う CREB の NR4A1 遺伝子プロモーターへの結合阻害を見出した (論文投稿中)。

研究項目(3). 低濃度 MeHg の直接的な作用点および標的分子の同定については、DNMT1 の MeHg 上昇が転写レベルではないことを見出し、DNMT1 の安定性に注目した。DNMT1 はメチル化を受けると分解が促進することから、メチル化酵素である SET7 および SET8、脱メチル化酵素である LSD1 の発現を解析したところ、MeHg により SET7 発現の減少、ならびに LSD1 発現の上昇をタンパクレベルで確認した。

以上の結果から、低濃度 MeHg における神経分化に及ぼす影響に関する新たなエピジェネティクスメカニズムの一端を提示することができた。本成果は、未だ世界レベルでは、議論の余地が残っている低濃度 MeHg 曝露による胎児への影響について、新たな科学的知見を与えるものである。また、本成果で見出されたエピジェネティクスに注目した分子メカニズムの知見は、今後の胎盤を通過する新たな化合物の神経分化への影響の毒性影響や分子メカニズムを予測する上で、役立つと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Go Suzuna, Kurita Hisaka, Hatano Manami, Matsumoto Kana, Nogawa Hina, Fujimura Masatake, Inden Masatoshi, Hozumi Isao	4. 巻 95
2. 論文標題 DNA methyltransferase- and histone deacetylase-mediated epigenetic alterations induced by low-level methylmercury exposure disrupt neuronal development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1227 ~ 1239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-021-02984-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 栗田尚佳
2. 発表標題 胎生期化学物質曝露による次世代の毒性発現メカニズムの研究
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 日本毒性学会 奨励賞（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郷すずな、畑野 愛、松本夏南、栗田尚佳、位田雅俊、保住 功
2. 発表標題 胎生期における低濃度環境化学物質曝露が神経分化に及ぼす影響およびエピゲノム解析
3. 学会等名 第46日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go S., Matsumoto K., Hatano M., Kurita H., Inden M., Hozumi I.
2. 発表標題 Analysis of epigenetic effect of low-level methylmercury on neuronal differentiation by using an in vitro model.
3. 学会等名 Hawaii 15th International Congress of Toxicology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurita H., Hatano M., Go S., Matsumoto K., Inden M., Hozumi I.
2. 発表標題 Determination of epigenetic modifications in fetal brain exposed to methylmercury during development.
3. 学会等名 Hawaii 15th International Congress of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田尚佳
2. 発表標題 神経発達期におけるメチル水銀によるエピジェネティクス変化の解析
3. 学会等名 平成31年度重金属等による健康影響に関する総合的研究 メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野川 斐奈、郷 すずな、畑野 愛、松本 夏南、栗田 尚佳、位田 雅俊、保住 功
2. 発表標題 環境化学物質暴露の神経分化に及ぼす影響とDNAメチル化の関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------