

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790134

研究課題名（和文）メチル水銀による小脳障害メカニズム「炎症仮説」の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying inflammatory hypothesis of cerebellum damage caused by methylmercury

研究代表者

廣岡 孝志 (HIROOKA TAKASHI)

東京理科大学・薬学部 助教

研究者番号：50397519

研究成果の概要（和文）：メチル水銀の小脳顆粒細胞層への特異的な毒性発現は、組織の炎症性変化に起因する。しかしながら、メチル水銀による炎症反応の分子機構は未解明である。申請者は、メチル水銀が、脳微小血管細胞において組織の炎症性変化の進展に関与するヒアルロナンや Aldose reductase の発現を増加させることを明らかにした。以上の結果は、メチル水銀によるこれら分子の発現調節が、「炎症仮説」の分子基盤である可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：We hypothesize that selective damage of methylmercury to granular cell layer in cerebellum might be due to the inflammation of tissue caused by methylmercury. In present study, we found that methylmercury stimulates the synthesis of hyaluronan and expression of aldose reductase in cultured human brain microvascular cells. Hyaluronan and aldose reductase are involved in development of inflammatory lesion. These results suggest the possibility that regulation of expression of hyaluronan and aldose reductase might be one of the molecular mechanism underlying inflammation of cerebellar tissue caused by methylmercury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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，小脳障害，炎症仮説，脳微小血管内皮細胞，脳微小血管周皮細胞，ヒアルロナン，Aldose reductase

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として良く知られている。しかしなが

ら、水俣病が公式に報告されてから50年以上たった現在においても、そのメカニズム（pathogenesis）の詳細はほとんど不明である。

水俣病（メチル水銀中毒）の病理学的な最も大きな特徴として、部位特異的な中枢神経障害が挙げられる。すなわち、胎児性と成人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っており、胎児では組織傷害の局在性が低く中枢神経系全体の障害が観察される。これに対し、成人では大脳皮質の深い脳溝周辺組織である中心回、側頭回および視覚野の鳥距溝周辺組織や小脳の顆粒細胞層などに強い傷害が認められる。

成人の大脳皮質で観察されるメチル水銀の毒性発現の部位特異性に関しては、衛藤の浮腫仮説（*Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-573, 2001）が有力である。それによると、メチル水銀曝露による初期脳病変として浮腫が深い脳溝周辺組織に形成され、結果的に発生する組織循環障害によってその脳溝周辺組織の神経細胞が二次的に傷害される。申請者は浮腫仮説の分子基盤解明に取り組み、メチル水銀が脳微小血管内皮細胞および周皮細胞におけるVEGFシステムの自己分泌型／傍分泌型の血管透過性調節を亢進させることを示唆する結果を得ている。

メチル水銀の小脳における部位特異的な傷害発現については、浮腫仮説では十分に説明することができない。また、これまでの研究の多くは、顆粒細胞、プルキンエ細胞およびグリア細胞のメチル水銀毒性への感受性差に集中してきたが、感受性差だけでは小脳組織におけるメチル水銀の顕著な部位特異的な傷害の発現機構を理解することはできない。申請者らは、メチル水銀中毒ラットの小脳の病理組織学的検索の結果から、小脳障害のメカニズム（*pathogenesis*）として、メチル水銀による顆粒細胞の微細な傷害が引

き金となり、小脳顆粒細胞層に細胞傷害性T-リンパ球が浸潤して顆粒細胞にアポトーシスを誘発し、引き続いてマクロファージが浸潤して死細胞を貪食するとともに炎症性サイトカインを放出して顆粒細胞をさらに傷害するという炎症性変化の連鎖が顆粒細胞層の大規模な傷害をもたらすとする新たなメカニズム（*pathogenesis*）「炎症仮説」を提唱している。この仮説は、小脳組織において、メチル水銀が顆粒細胞特異的に毒性を発現するメカニズム（*pathogenesis*）を炎症性変化によって合理的に説明し得た点に大きな意義があるが、その確立には病理組織学的観察とリンクする分子基盤の解明が不可欠である。しかしながら、炎症反応の分子基盤は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メチル水銀による小脳障害メカニズム「炎症仮説」における、炎症反応の分子基盤を解明することである。そこでH21年度は免疫細胞の浸潤に関与するヒアルロナンの脳微小血管細胞の分泌に対するメチル水銀の作用を調べた。H22年度は、炎症性サイトカインによるアポトーシスの誘導に関与すると考えられるAldose reductaseの発現に対するメチル水銀の影響を調べた。

3. 研究の方法

(1)メチル水銀によるヒト脳微小血管構成細胞のヒアルロン酸合成促進

ヒト脳微小血管内皮細胞と周皮細胞をそれぞれ1, 2, および3 μM のメチル水銀で8, 12, 24 時間処理した。処理終了後、培地上清中のヒアルロン酸濃度をELISA分析により測定した。細胞層はギムザ染色後、形態

学的な観察に供した。別にメチル水銀で処理した細胞から抽出した Total RNA から作成した cDNA を用いて、ヒアルロナン合成酵素 (HAS-1, -2, -3) および UDP-グルコース脱水素酵素 (UGDH) をコードする mRNA の発現レベルを、Real-time RT-PCR 分析により調べた。さらに Total タンパク質を抽出し、Western blot 分析により HAS-1, -2, -3 および UGDH のタンパク質発現レベルを調べた。

(2) メチル水銀によるヒト脳微小血管周皮細胞の aldose reductase の発現変化

ヒト脳微小血管周皮細胞を 1, 3 および 5 μM のメチル水銀で 12 および 24 時間処理した。処理後、細胞から抽出した Total RNA より cDNA を作成し、Real-time RT-PCR 分析により aldose reductase mRNA の発現レベルを調べた。別に total タンパク質を用い、Western blot 分析により aldose reductase のタンパク質レベルでの発現変化を調べた。

4. 研究成果

(1) メチル水銀によるヒト脳微小血管構成細胞のヒアルロナン合成促進

ヒト脳微小血管を構成する内皮細胞および周皮細胞におけるヒアルロナン合成/分泌に対するメチル水銀の作用を調べた。メチル水銀は、内皮細胞および周皮細胞において、ヒアルロナン分泌量を濃度依存的および処理時間依存的に有意に増加させた。このとき、内皮細胞層ではメチル水銀の非特異的な細胞毒性発現による細胞層の退行性変化は認められなかったが、周皮細胞では細胞層の退行性変化を伴った細胞数の減少が見られた。次にヒアルロナンの細胞合成に関与する酵素 HAS-1, HAS-2, HAS-3 および UGDH の発現に対するメチル水銀

の作用を調べた。その結果、内皮細胞では HAS-2 および -3 mRNA の発現レベルの変化は認められなかったが、UGDH mRNA の発現レベルはメチル水銀により有意に上昇していた。この UGDH の発現レベルの上昇はタンパク質レベルでも確認された。周皮細胞では、HAS-2, -3 および UGDH mRNA の発現レベルがメチル水銀によって有意に上昇していた。一方、タンパク質レベルでは、HAS-2 の発現レベルの上昇が確認された。HAS-1 の発現は、いずれの細胞においても検出されなかった。

これらの結果は、メチル水銀が内皮細胞および周皮細胞に対して異なる様式で作用し、そのヒアルロナン合成を促進させることを示している。本研究は、メチル水銀の脳微小血管構成細胞に対するヒアルロナン合成促進作用を明らかにした最初の例である。

(2) メチル水銀によるヒト脳微小血管周皮細胞の aldose reductase の発現変化

糖代謝経路の 1 つであるポリオール経路の主要酵素である aldose reductase は glucose の sorbitol への変換反応を行う。本酵素の活性化による sorbitol の細胞内への異常蓄積は、細胞膨張を引き起こす。また、種々の炎症性サイトカインによる細胞死の誘発や炎症細胞の機能制御に関与している可能性も報告されている。これまでに、我々は、ヒト脳微小血管周皮細胞がメチル水銀処理により膨張様の形態変化を示すことを確認している。そこで、次にメチル水銀処理した周皮細胞における aldose reductase の発現レベルを Real-time RT-PCR 分析および Western blot 分析により調べた。その結果、メチル水銀は、周皮細胞の aldose reductase mRNA の発現レベルを濃度依存

的に有意に上昇させた。さらにタンパク質レベルにおける aldose reductase の発現増加も認められた。

これらの結果は、メチル水銀が aldose reductase の発現上昇を介した細胞内 sorbitol の過剰蓄積により、周皮細胞を膨張させている可能性を示唆している。

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それぞれに対して特異的な毒性作用を発現し、血管周辺組織へのヒアルロナンの過剰蓄積、aldose reductase の発現調節による血管細胞の障害を引き起こし、浮腫形成や炎症細胞の浸潤を誘発することにより血管周辺組織の炎症反応を促進させる可能性を示唆している。これらメチル水銀の毒性発現を担う生体分子の発現調節が、「炎症仮説」の分子基盤の1つ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には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Takashi Hirooka, Yasuyuki Fujiwara, Yasuhiro Shinkai, Chika Yamamoto, Akira Yasutake, Masahiko Sato, Komyo Eto and Toshiyuki Kaji (2010) Resistance of human brain microvascular endothelial cells in culture to methylmercury: cell-density-dependent defense mechanisms. The Journal of Toxicological Sciences, 35, 287-294. 査読有り。

② Takashi Hirooka, Yasuyuki Fujiwara, Yuka Minami, Akihiko Ishii, Mio Ishigooka, Yasuhiro Shinkai, Chika Yamamoto, Akira Yasutake, Masahiko Sato, Komyo Eto and Toshiyuki Kaji (2010) Cell-density-dependent

methylmercury susceptibility of cultured human brain microvascular pericytes. Toxicology in Vitro, 24, 835-841. 査読有り。

[学会発表] (計8件)

① 廣岡 孝志, 傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層の修復に対するメチル水銀の阻害作用は低酸素下において増強される, 日本薬学会第131年会, 2011年3月30日, 静岡

② 廣岡 孝志, The microvascular cells are a target of methylmercury toxicity, NIMD FORUM 2011 Methylmercury toxicology: Up-to-date Research on Mechanisms, Toxicology and Pathology, 2011年1月27日, 水俣市

③ 廣岡 孝志, ヒト脳微小血管内皮細胞層に対するメチル水銀の毒性発現は低酸素環境下において増強される, フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010年9月10日, 東京

④ 廣岡 孝志, メチル水銀の血管毒性に関する研究, フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー (平成22年度日本薬学会環境・衛生部会賞受賞講演), 2010年9月10日, 東京

⑤ 廣岡 孝志, メチル水銀はヒト脳微小血管内皮および周皮細胞のヒアルロナン合成を誘導する, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月18日, 沖縄

⑥ 廣岡 孝志, メチル水銀は脳浮腫形成に関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 30 日, 岡山

⑦廣岡 孝志, 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ナン合成を促進する, フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009 年 11 月 6 日, 沖縄

⑧廣岡 孝志, 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 (優秀研究発表賞受賞), 2009 年 7 月 7 日, 岩手県

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣岡 孝志 (HIROOKA TAKASHI)

東京理科大学 薬学部 助教

研究者番号 : 50397519