

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590167

研究課題名(和文) マイクロダイセクション法を用いたメチル水銀による選択的神経細胞障害に関する研究

研究課題名(英文) Experimental research on selective neuronal damage by methylmercury using microdissection method

研究代表者

藤村 成剛 (Fujimura, Masatake)

国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・室長

研究者番号：20416564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロダイセクション装置を用いてラット小脳の各神経細胞層(プルキンエ細胞、顆粒細胞、分子層神経細胞)を分離し、抗酸化酵素のmRNA発現量について検討した。その結果、メチル水銀による顆粒細胞の脆弱性に抗酸化酵素であるMn-SOD、GPx1およびTRxR1発現量の少なさが関与することが示唆された。

また、低濃度メチル水銀の胎児期曝露によって神経病変を誘発せずに神経機能障害(協調運動障害)を発症する原因について探究し、低濃度メチル水銀によって小脳顆粒細胞特異的なシナプス形成不全が生じていることを見出した。

研究成果の概要(英文)： We isolated granule, Purkinje and molecular layer's neurons in rat cerebellum by using microdissection system and performed real-time PCR analyses for anti-oxidative enzymes. The results suggest that low expression of anti-oxidative enzymes (Mn-SOD, GPx1 and TRxR1) causes CGCs vulnerability to MeHg toxicity.

Next, neurobehavioral analyses revealed that exposure to a low level of MeHg during developmental cause a significant deficit in the motor coordination of rats. The expression of synaptophysin, a marker protein for synaptic formation, significantly decreased in cerebellar granule cells. These results showed that exposure to low-dose MeHg during development induces the dysfunction of motor coordination due to changes of synaptic homeostasis in cerebellar granule cells.

研究分野：医歯薬学

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 マイクロダイセクション 小脳顆粒細胞

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

水俣病に代表されるメチル水銀中毒症は、通常の毒性物質が通過できない脳血液関門をメチル水銀が通過し、重篤かつ不可逆的な神経障害を引き起こす疾患である。その原因病巣は主に中枢神経および末梢神経であり、病巣部位に伴う特徴的な神経障害が報告されているが、その部位や細胞種は限定されている。成人期におけるメチル水銀中毒においては、小脳顆粒細胞、大脳皮質深部、後根神経に神経変性（細胞死、軸索変性）が認められるが、小脳プルキンエ細胞、海馬、前根神経では病変を引き起こさない。

このようなメチル水銀毒性の選択的神経細胞障害については、水俣病が発見された1950年代から現在にいたるまで、様々な研究が行われてきたが、未だ解明には至っていない。本選択的神経細胞障害のメカニズムが解析されれば、原因因子の解明によるメチル水銀中毒の診断、予防および治療において有益な情報になりうるはずである。申請者等（藤村、臼杵）もこの選択的神経細胞障害の決定因子を探求すべく実験動物であるマウスおよびラットを用いて研究を行ってきた。マウスを用いた研究では、メチル水銀曝露が虚血等の外部刺激に脆弱性が高い海馬には影響しないが、大脳皮質深部に特異的に神経病変（神経細胞死）を発生させ、その原因として大脳皮質深部に特異的に c-jun-N-terminal kinase 経路の活性化が関与していることを見出した。なお、本実験において組織への水銀蓄積性の違いを疑ったが、組織中水銀濃度と神経病変には関係が無いことが明らかになった。また、ラットを用いた研究において、知覚神経系である前根神経には神経変性（神

経細胞死、軸索変性等）を引き起こさないが、感覚神経系である後根神経に特異的な神経変性を生じさせ、その原因として Rho-ROCK 経路の活性化が関与していることを明らかにした。上記決定因子の解析においては各脳神経部位をピンセットにより分離し、特定蛋白質の増減をウェスタンブロッティングにより同定する手法を用いた。しかしながら、本手法では特定の神経細胞を個別に分取することは不可能である。よって、上記の手法により解析した結果は、多種多様な神経細胞や神経細胞以外のグリア細胞も含むサンプルを解析した結果であり、実際に障害を受けている神経細胞のみの情報ではないため、メカニズム解明の一端には成り得るが根本解明には到達していないことが現実である。一方、細胞個々の蛋白質および mRNA 発現の解析方法として組織切片を用いた免疫染色法や In situ hybridization 法があるが、解析にはある程度の発現量が必要で、かつ定量性にも乏しいことから細胞個々の因子解明に用いるには不十分である。

それでは細胞個々の因子解析を行う方法はあるのだろうか？ 近年、組織切片上からマイクロダイセクション法によって、細胞個々を分離し、その mRNA 発現量を測定する画期的な手法が開発された。本方法を用いれば細胞個々のメチル水銀毒性に対する寄与が明らかになり、メチル水銀毒性の選択的神経細胞障害の詳細解析が可能になる。現在、様々な研究分野において本方法を用いた解析による成果が出てきている。

2. 研究の目的

本研究では、実験動物においてもメチル水

銀毒性中毒と同様の病変が得られた3部位（小脳顆粒細胞、後根神経、大脳皮質深部）に絞り込み、研究を行う。まず、実験動物としてラットを用いてメチル水銀中毒モデルを作成し、マイクロダイセクションシステムを用いて小脳の顆粒細胞とプルキンエ細胞を分離し、小脳神経細胞の毒性防御系および機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子群（Ubiquitin-proteasome 経路、Autophagy-lysosome 経路等）の発現増減について測定を行う。また、同じラットを用いて末梢神経である後根神経と前根神経を分離し、神経軸索の維持に関係する Rho/ROCK 経路等について測定を行う。次に実験動物としてマウスを用いたメチル水銀中毒モデルにおいて大脳皮質深部と海馬を分離し、酸化ストレス因子等の発現について測定を行う。更に決定因子候補蛋白の機能を明確に証明するために、動物実験によって絞られた候補蛋白を培養神経細胞中で変動させることによって、メチル水銀毒性に対する影響を検証する。以上の研究によって、メチル水銀中毒に特異的な選択的神経細胞障害の決定因子を確定する。

3. 研究の方法

本研究では、まず、実験動物としてラットを用いてメチル水銀中毒モデルを作成し、マイクロダイセクションシステムを用いて小脳の顆粒細胞とプルキンエ細胞を分離し、小脳神経細胞の毒性防御系および機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子群（Ubiquitin-proteasome 経路、Autophagy-lysosome 経路等）の発現増減について測定を行う。また、同じラットを用いて末梢神経である後根神経と前根神経を分離し、神経軸索の維持に関係する Rho/ROCK 経路等について測定を行う。次に実験動物と

してマウスを用いたメチル水銀中毒モデルにおいて大脳皮質深部と海馬を分離し、酸化ストレス因子等の発現について測定を行う。更に決定因子の機能を明確に証明するために、動物実験によって絞られた決定因子候補蛋白を培養神経細胞中で変動させることによって、メチル水銀毒性に対する影響を検証する。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系へのメチル水銀毒性に関する

マイクロダイセクション法を用いた解析ラットを用いたメチル水銀曝露モデルでは小脳において小脳顆粒細胞特異的に神経病変（神経細胞核の濃縮、TUNEL 陽性神経細胞、GFAP 陽性アストロサイト、および Iba1 陽性ミクログリアの発現）が起こる。この現象はヒトにおけるメチル水銀中毒と類似しており、メチル水銀の小脳における神経毒性メカニズム研究に有用である。マイクロダイセクション装置を用いてラット小脳の各神経細胞層（プルキンエ細胞、顆粒細胞、分子層神経細胞）を分離し、抗酸化酵素である Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, GPx1, TRxR1 および Catalase の mRNA 発現量について検討した。その結果、メチル水銀毒性に対して脆弱な顆粒細胞層において他の神経細胞（プルキンエ細胞、分子層神経細胞）よりも Mn-SOD, GPx1 および TRxR1 の mRNA が少ないことが明らかになった。この結果は免疫組織染色による各蛋白質の分布と一致し、メチル水銀による顆粒細胞の脆弱性に Mn-SOD, GPx1 および TRxR1 発現量の少なさが関与することが示唆された。

さらに、硫化水素産生酵素の各神経細胞 mRNA についても発現解析を行った。その結果、メチル水銀毒性に対して抵抗性を示す神経細胞層（プルキンエ細胞、分子層神経細胞）

において硫化水素産生酵素(CSE, CBS) の発現がメチル水銀毒性に対して脆弱な顆粒細胞層よりも多いことを明らかにした。この結果は免疫組織染色による蛋白質の分布と一致した。さらに、CSE KO マウスにおいて、メチル水銀曝露によって振戦を伴う選択的なプルキンエ細胞傷害が観察された。以上のことから、メチル水銀毒性に対する抵抗性に硫化水素が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) メチル水銀の胎児期曝露における中枢神経病変の解析

実験動物 (ラット) へのメチル水銀胎児期曝露 (5 ppm, 飲水投与) によって小脳顆粒細胞のシナプス形成蛋白である Synaptophysin 減少を伴う協調運動障害が引き起こされることが明らかになった。この結果から、メチル水銀の胎児期曝露による協調運動障害が本蛋白の減少に起因することが示唆された。さらに、Synaptophysin 低下の原因と考えられる、メチル水銀の胎児期曝露によって脳内で減少する神経栄養因子関連物質 (BDNF 抗体に反応するが、分子量が本来の BDNF の分子量である 27 kD よりも大きい) について、質量分析法を用いた同定を試みた。その結果、腫瘍抑制因子の一種で細胞形成にも関与する Maspin, シグナル伝達を制御する B-cell linker protein (BLNK), およびペプチド延長因子である Elongation factor 1 (EF-1) を原因候補物質として同定することができた。

さらに、メチル水銀の胎児期曝露によって引き起こされる小脳のシナプス異常の原因因子と考えられる候補物質 (eEF1A) について、培養細胞を用いた機能判定 (siRNA を用いた標的蛋白の低下) を行った。その結果、eEF 1A の発現低下がシナプス形成因子であ

る Synaptophysin の発現を低下させた。なお、この eEF1A の低下は神経細胞死および神経突起形成そのものには影響が少なかった。以上のことから、メチル水銀の胎児期曝露が eEF1A の発現低下を介して小脳のシナプス異常を引き起こしていることが示唆された。

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4件)

- (4) Fujimura M, Usuki F: Low *in situ* expression of antioxidative enzymes in rat cerebellar granular cells susceptible to methylmercury. Arch. Toxicol., 88, 109-113 (2014).
- (3) Cheng J, Fujimura M, Zhao W, Wang W: Neurobehavioral effects, c-Fos/Jun expression and tissue distribution in rat offspring prenatally co-exposed to MeHg and PFOA: PFOA impairs Hg retention. Chemosphere, 91, 758-764 (2013).
- (2) Bourdineaud JP, Laclau M, Maury-Brachet R, Gonzalez P, Baudrimont M, Mesmer-Dudons N, Fujimura M, Marighetto A, Godefroy D, Rostène W, Brêthes D: Effects of methylmercury contained in a diet mimicking the Wayana Amerindians contamination through fish consumption: mercury accumulation, metallothionein induction, gene expression variations, and role of the chemokine CCL2. Int. J. Mol. Sci., 13, 7710-7738 (2012).
- (1) Fujimura M, Cheng J, Zhao W: Perinatal

exposure to low dose of methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases of synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. Brain Res., 1464, 1-7 (2012).

〔学会発表〕(計2件)

- (2) Fujimura M, Usuki E: Low *in situ* expression of antioxidative enzymes in rat cerebellar granular cells susceptible to methylmercury. 第36回日本分子生物学会年会, (2013).
- (1) Fujimura M, Cheng J, Zhao W: Perinatal exposure to low dose of methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases of synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. 52nd Society of Toxicology, (2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nimd.go.jp/kakubu/kiso/fujimura.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 成剛 (FUJIMURA MASATAKE)

国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・室長

研究者番号：20416564

(2) 研究分担者

臼杵 扶佐子 (USUKI FUSAKO)

国立水俣病総合研究センター・臨床部・部長

研究者番号：50185013