

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

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790157

研究課題名（和文）メチル水銀の細胞性浮腫発生の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying cytotoxic edema induced 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）：メチル水銀の脳組織の部位選択的な障害は、脳浮腫形成に起因する。しかしながら、メチル水銀による細胞性浮腫の分子機構は不明であった。申請者は、メチル水銀が、ヒト脳微小血管周皮細胞において p38 MAPK 経路と転写因子 Nrf2 活性化を介したポリオール経路のアルドース還元酵素の発現誘導を通じて細胞性浮腫を誘発する可能性を明らかにした。以上の結果は、メチル水銀による細胞性浮腫の分子基盤を示した最初の例である。

研究成果の概要（英文）：Selective damage of the cerebrum in the patients with Minamata disease is attributed to methylmercury induced-cerebral edema. The purpose of the present study was to investigate the molecular mechanisms of cytotoxic edema caused by methylmercury. Aldose reductase dysfunction in polyol pathway is known to causes cytotoxic edema. We founded that methylmercury induced aldose reductase expression via p38 MAPK and transcription factor Nrf2 activation in cultured human brain microvascular pericytes. These results suggest the possibility that induction of aldose reductase expression might be one of the molecular mechanism underling cytotoxic edema induced by methylmercury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、浮腫仮説、細胞性浮腫、ポリオール経路、アルドース還元酵素、ソルビトール脱水素酵素、p38 MAPK, Nrf2

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は、我が国の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の正確な理解には、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、水俣病の公式確認から半世紀以上経過した現

在においてもその詳細はほとんど理解されていない。水俣病に代表されるメチル水銀中毒症の病理学的な特徴として、メチル水銀による脳組織の傷害部位とその程度が胎児性と成人性で大きく異なることが挙げられる。すなわち、メチル水銀の影響は胎児では

組織傷害の局在性が低く脳全体が傷害される。一方、成人では大脳皮質の中心溝や視覚野の鳥距溝などの深い脳溝周辺組織および小脳顆粒細胞層が部位選択的に強く傷害される。

成人の大脳皮質で観察されるメチル水銀毒性発現の部位選択性は、衛藤により提唱された「浮腫仮説」(*Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-573, 2001)により説明できる。すなわち、メチル水銀毒性の部位選択性は、初期症状である浮腫形成と二次的な深い脳溝周辺組織の循環障害による、神経細胞のメチル水銀毒性に対する脆弱性の増加により引き起こされると説明できる。しかし、メチル水銀による浮腫発生のメカニズムは不明であった。

浮腫は、発生機構により大きく血管性と細胞性に分類される。前者は、血管透過性が異常亢進することにより起こる。これに対して、後者は、細胞が膨張することによって起こる。申請者は浮腫仮説について血管性の浮腫発生メカニズムの解明に取り組み、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により、血管性浮腫を誘発することを示唆する結果を得ている。一方、メチル水銀による細胞性浮腫の発生メカニズムの理解も、「浮腫仮説」の分子基盤の確立において不可欠であるが、そのメカニズムに関しては未だ十分に解明されていない。

申請者らは、メチル水銀がヒト脳微小血管周皮細胞に浮腫性と推察される形態学的変化を誘発することを見出した。そのメカニズムとしてメチル水銀によるポリオール経路の調節に注目した。本経路は、糖代謝の副経路でありアルドース還元酵素 (Aldose reductase ; AR) とソルビトール脱水素酵素 (Sorbitol dehydrogenase ; SDH) により構成され、AR によりグルコースから変換されたソルビトールを SDH がフルクトースに変換する。AR の活性化もしくは SDH の活性低下による細胞内ソルビトールの蓄積は、細胞内浸透圧を上昇させ、浮腫性変化を誘発することが知られている

(*Adv. Physiol. Educ.*, **28**, 155-159, 2004)。しかしながら、メチル水銀の脳微小血管細胞のポリオール経路への毒性作用と細胞性浮腫形成への関与は全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メチル水銀による細胞

性浮腫形成におけるポリオール経路の構成酵素である AR および SDH の関与とその分子機構を明らかにすることである。そこで平成 23 年度は、AR と SDH の発現に対するメチル水銀の作用と細胞性浮腫形成との関係について検討した。次に平成 24 年度では、周皮細胞の AR と SDH の酵素活性に対するメチル水銀の毒性作用およびメチル水銀による AR の発現誘導メカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) メチル水銀処理によるヒト脳微小血管周皮細胞の形態学的観察

ヒト脳微小血管内皮細胞と周皮細胞をそれぞれ 1, 3 および 5 μM のメチル水銀または 25 mM グルコースで 24 時間処理した。また、別に AR をノックダウンした周皮細胞を 25 mM グルコースで 24 時間処理した。処理後、位相差顕微鏡にて細胞形態の変化を観察した。

(2) メチル水銀によるアルドース還元酵素およびソルビトール脱水素酵素の発現誘導

内皮細胞と周皮細胞を 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 AR および SDH をコードする mRNA の発現レベルを調べた。別に total タンパク質を用い、Western blot 分析により両酵素のタンパク質レベルでの発現変化を調べた。

(3) アルドース還元酵素とソルビトール脱水素酵素の活性変化

内皮細胞と周皮細胞を 1, 3 および 5 μM のメチル水銀で 24 時間処理した。処理後、細胞から粗酵素液を得た。酵素活性は、粗酵素液に酵素基質および補酵素を加え 340 nm における吸光度の減少または増加に基づき算出した。AR 活性測定には基質として DL-グリセルアルデヒドを、補酵素として NADPH を用いた。SDH 活性測定には基質としてソルビトールを、補酵素として NAD を用いた。

(4) メチル水銀によるアルドース還元酵素の発現誘導機構

内皮細胞、周皮細胞および Nrf2 をノックダウンした周皮細胞を 1, 3 および 5 μM のメチル水銀もしくは 25 mM グルコースで 24 時間処理した。処理後、各細胞から抽出した total タンパク質を用い、Western blot 分析により ERK1/2,

p38 MAPK および JNK のリン酸化レベル、Nrf2 および AR の発現レベルを調べた。

4. 研究成果

メチル水銀で処理した内皮細胞では、細胞性浮腫と推察される形態学的変化、アルドース還元酵素 (AR) およびソルビトール脱水素酵素 (SDH) の発現変化は認められなかった。これに対し、メチル水銀処理した周皮細胞では、紡錘形から敷石状となる浮腫性の形態学的変化が認められた。このとき、周皮細胞においてメチル水銀による AR の発現上昇と SDH の発現低下が mRNA およびタンパク質レベルで認められた。過剰量のグルコース処理が、ポリオール経路を介した細胞内ソルビトール蓄積量を増加させることが知られている。そこで、高グルコース処理による周皮細胞の形態変化を調べた。その結果、メチル水銀処理と同様に細胞の敷石状への形態変化と AR 発現の上昇が観察され、RNA 干渉法による AR のノックダウンにより高グルコースによる浮腫様の形態変化は抑制された。メチル水銀は、SDH の活性部位に直接結合することによりその活性を制御することが報告されている。このことは、メチル水銀は、発現制御だけでなく翻訳後調節によっても AR および SDH の活性を調節している可能性を示唆している。そこで、AR と SDH の酵素活性を吸光度法により測定した。その結果、メチル水銀処理により浮腫性の変化が認められなかった内皮細胞では、AR および SDH の活性に変化は認められなかった。一方、周皮細胞では、メチル水銀処理により AR の活性が濃度依存的に上昇した。しかしながら、SDH 活性には変化は認められなかった。この結果は、メチル水銀がポリオール経路の AR を活性化することにより細胞内のソルビトール蓄積量を増加させ、周皮細胞に浮腫性の形態変化を誘発させることを示唆している。さらに、この AR の活性化を介した形態変化は、血管細胞では、周皮細胞に特異的であり内皮細胞では起こらないことも示された。

MAPK 経路および転写因子 Nrf2 が AR の発現誘導に関与していることが分かっている。そこで、周皮細胞でのメチル水銀による AR 発現誘導に対する MAPK 経路および Nrf2 の関与を調べた。その結果、メチル水銀は p38 MAPK のリン酸化レベルを有意に上昇させた。また、p38 MAPK 特異的な阻害剤 SB203580 の前処理により、メチル水銀による AR 発現誘導は抑制された。さらにメチル水銀処理により Nrf 2 が活性化され、Nrf2 のノックダウン処理によりメチル水銀による AR 発現誘導は

強く抑制された。

以上の結果から、メチル水銀は周皮細胞において、p38 MAPK 経路および転写因子 Nrf2 の活性化を介して AR の発現を誘導し、細胞内ソルビトールの蓄積促進により細胞性浮腫を引き起こしていることが示唆された。本研究の結果は、メチル水銀によるポリオール経路の機能阻害が細胞性浮腫形成における分子基盤である可能性を明らかにした最初の例である。

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 1 件)

Hirooka Takashi, Kaji Toshiyuki, The cytotoxicity of methylmercury in human brain microvascular endothelial cells and pericytes in culture. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 1-5 (2012), 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 平田明成 (廣岡孝志), 培養血管内皮および周皮細胞のポリオール経路に対するメチル水銀の毒性, メチル水銀ミーティング, 2011 年 12 月 21 日, 東京
- (2) 平田明成 (廣岡孝志), 培養ヒト脳微小血管細胞のポリオール経路に対するメチル水銀の毒性, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 31 日, 北海道
- (3) 平田明成 (廣岡孝志), 血管周皮細胞のポリオール経路に対するメチル水銀の毒性, 第 39 回 日本毒性学会学術年会, 2012 年 7 月 17 日, 仙台
- (4) 廣岡孝志, メチル水銀の傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層に対する修復阻害作用は低酸素により増強される, 第 39 回 日本毒性学会学術年会, 2012 年 7 月 17 日, 仙台
- (5) Akishige Hirata (Takashi Hirooka), Induction of aldose reductase expression and reduction of sorbitol dehydrogenase expression by methylmercury in cultured human brain microvascular pericytes., The Sixth International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月 20 日, 仙台

(6) Takashi Hirooka, Hypoxia potentiates the inhibitory effect of methylmercury on the repair of damaged monolayers of human microvascular endothelial cells., The Sixth International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月20日, 仙台

(7) 平田明成 (廣岡孝志) メチル水銀がヒト脳組織において誘発する浮腫性変化のメカニズムとしてのポリオール経路の機能障害, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012年10月25日, 名古屋

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.rs.tus.ac.jp/kaji-lab/index_1.html

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :