

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659426

研究課題名(和文)メチル水銀中毒に対する新規治療標的分子としての血管内皮細胞増殖因子の検討

研究課題名(英文) Analysis of vascular endothelial growth factor as novel therapeutic target for methylmercury poisoning

研究代表者

下畑 享良 (Shimohata, Takayoshi)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：60361911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：水俣病，新潟水俣病で知られるメチル水銀中毒に伴う神経障害の機序を，「微小血管障害」という新しい観点から検討した．強力な血管透過性亢進作用をもち「微小血管障害」を引き起こす血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に注目した．本研究により，VEGF発現の亢進が血液脳関門の破綻を引き起こし，神経障害に関わる可能性が示唆された．さらにVEGF抑制療法が神経障害を抑制する可能性を示した．

研究成果の概要(英文)：Minamata disease and Niigata Minamata disease are methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. We analyzed the mechanism by which methyl-mercury causes brain damage from a standpoint of blood brain barrier (BBB) damage. We demonstrated that methylmercury caused up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat brain, and caused BBB damage. We also demonstrated that VEGF inhibition by anti-VEGF neutralizing antibody may ameliorate brain damage associated with methylmercury poisoning.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：水俣病 メチル水銀中毒 血管内皮細胞増殖因子 血液脳関門

## 1. 研究開始当初の背景

毒性の強い有機水銀であるメチル水銀による中毒として、国内では水俣病や新潟水俣病が、国外ではヴィクトリア湖(タンザニア)、吉林市(中国)、パキスタンなどが知られている。最近の例ではアマゾン川上流の水銀汚染が挙げられる。すなわちメチル水銀中毒は発展途上国を中心に今なお生じている重要な問題である。メチル水銀中毒の中核症状は、求心性視野狭窄、小脳失調、感覚障害である。病理学的にはそれらに対応する後頭葉、小脳、後根神経節の神経細胞障害がみとめられる。さらに浮腫や点状出血が認められ、微小血管障害の存在も示唆される。しかしなぜこれらの部位に特徴的な病変が生じるのか、なぜ微小血管障害をきたすかは今なお不明である。治療として、第一にキレート剤が使用されるが、キレート剤による脳組織からのメチル水銀の除去には限界があり、かつ急性期しか効果が期待できないため、水銀曝露後に起こる神経毒性のメカニズムを解明し、新たな治療標的分子を明らかにすることが望まれる。

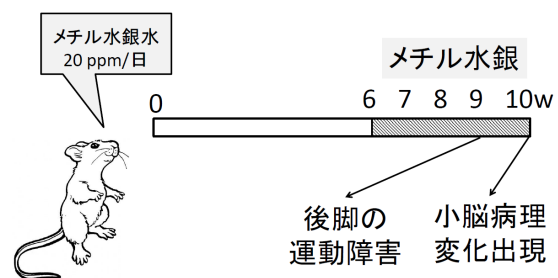
## 2. 研究の目的

水俣病、新潟水俣病で知られるメチル水銀中毒に伴う神経障害の機序を、「微小血管障害」という新しい観点から検討した。具体的には強力な血管透過性亢進作用をもち「微小血管障害」を引き起こす血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に注目し、メチル水銀中毒に特徴的な中枢神経病変分布が VEGF シグナルカスケードの活性化により説明が可能か、さらに VEGF がメチル水銀中毒に対する新規治療標的分子となるかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

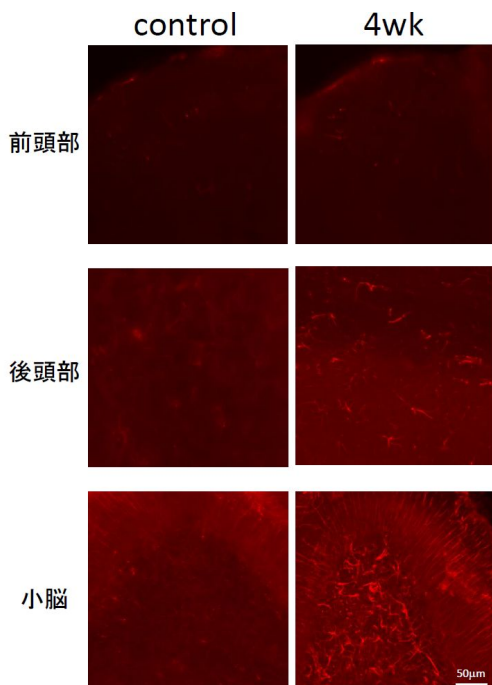
6週令の Wistar ラットの雄に対し、メチル水銀飲水曝露(20 ppm のメチル水銀水)を4週間行った。以後、経時的に体重変化、神経症状、組織水銀量についての確認を行った。そして10週令で解剖を行った。上記モデルに対し、摘出した脳試料の半分は灌流固定し、ホルマリン固定、パラフィン切片および水銀含量測定用に使用した。一方の半分は灌流固定なしで組織を凍結保存し、生化学測定および凍結切片に用いた。生化学測定は片脳の大脳皮質を前頭葉、頭頂葉、後頭葉に3分割したものを、および小脳に分けて検討した。BBB 関連蛋白について免疫染色およびウエスタンブロット法で評価した。運動機能評価は後脚交叉現象を用いた。

さらに抗ラット VEGF 中和抗体、ないしコントロール抗体 IgG を経静脈的に投与し、VEGF の抑制が運動機能(後肢の運動障害、交叉現象にて評価)に与える影響を確認した。病理変化は小脳や大脳皮質に対する検索を行った(図)。



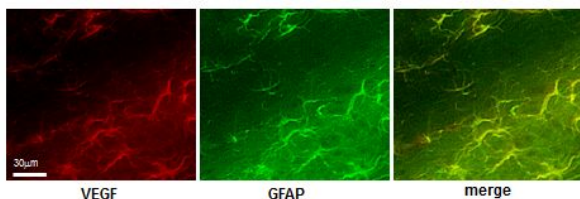
#### 4. 研究成果

ラットへの4週間メチル水銀投与により、小脳において VEGF の発現亢進が認められた(図)。また後頭葉においても軽度ながら発現が認められた。

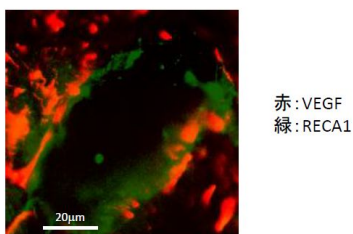


免疫組織化学によるVEGF発現  
4週投与群の小脳で著明なVEGF(赤)の発現亢進が認められた。

発現亢進はアストロサイトで主に認められた。アストロサイトのマーカー蛋白である GFAP と共局在が認められた(図)。



血管内皮の外側に VEGF の発現が認められ、血管でもアストロサイトに発現していた(図)。



免疫組織化学によるVEGFの局在(1)  
VEGF(赤)は血管内皮細胞のマーカーであるRECA1(緑)陽性細胞の周囲に認められた。

また血液脳関門(BBB)構成タンパクの中で、RECA-1発現の低下と,IgG 経静脈投与後のBBBからの漏出が認められた。メチル水銀中毒の病態として,VEGF 発現の亢進が BBB の破綻を引き起こし,神経障害に関わる可能性が示唆された。つぎに抗ラット VEGF 中和抗体(RB222)を経静脈的に投与したところ,コントロール抗体(IgG)と比較し,運動機能の改善の傾向を認めた。この結果はメチル水銀亜急性中毒に対し,VEGF 抑制療法が BBB 破綻を緩和し,神経障害を抑制した可能性を示唆する。

今後,VEGF 抑制療法がメチル水銀中毒に伴う神経障害を緩和するか,種々のモデルで検討を行う必要がある。

#### 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0件)

[学会発表](計2件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0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0件)

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

研究者番号：

〔その他〕

ホームページ等

Facebook ページ「新潟大学脳研究所神経内科  
脳循環代謝チーム」にて、学会における発表  
のサマリー等を紹介している。

<https://www.facebook.com/NiigataCBFM>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下畑 享良 (Shimohata, Takayoshi)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：60361911

### (2) 研究分担者

高橋 哲哉 (Takahashi, Tetsuya)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20515663

臼杵 扶佐子 (Usuki, Fusako)

国立水俣病総合研究センター臨床部・室長

研究者番号：50185013

藤村 成剛 (Fujimura, Masatake)

国立水俣病総合研究センター基礎研究  
部・病理室・室長

研究者番号：20416564

### (3) 連携研究者

( )