

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460187

研究課題名(和文) 低濃度メチル水銀の胎児期曝露における神経症状誘発因子に関する研究

研究課題名(英文) Research on inciting factor of neurological symptoms following low dose methylmercury exposure in fetal period

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

研究成果の概要(和文)：ラットを用いた実験系において、神経細胞死を生じさせない低濃度メチル水銀(5 ppm 飲水投与)の胎児期曝露によって生じる神経症状(協調運動不全)の原因の一つが、小脳における eEF1A1 の発現抑制を介した神経突起形成不全であることを明らかにした。また、ラット神経前駆細胞を用いた実験系において、低濃度メチル水銀(10 nM)が、GSK-3bの発現誘導を介して神経細胞の増殖を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We clarified that a low level methylmercury exposure (5 ppm in drinking water) during fetal period induced neurological symptoms without inducing neuronal cell death through the suppression of eEF1A1 and subsequent nerve hypoplasia in rat cerebellum. Furthermore, we also clarified that a low level methylmercury (10 nM) inhibited the proliferation of neuronal cells through the induction of GSK-3b in neural progenitor cells of rats.

研究分野：神経毒性学

キーワード：低濃度メチル水銀 胎児期曝露 神経症状

## 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

メチル水銀の胎児期曝露は剖検脳研究から、広域な脳神経部位に神経病変(神経細胞死およびグリオシス等)を誘発し、その結果、神経症状を生じると考えられている。しかしながら、神経病変が観察されたのは高濃度曝露による重症例であり、現在、注目されている、より低濃度の曝露においては、神経病変を生じなくても神経症状を呈していると考えられる。低濃度メチル水銀の胎児期曝露影響については、2つの研究が有名である。“フェロー諸島出生コホート研究”においては、7歳児と14歳児で神経系の検査が行われ、記憶、注意、言語などの能力が出生時のメチル水銀の増加に伴って低下した。一方、“セイシェル小児発達研究”においては、5.5歳児と9歳児で神経系の検査が行われたが、メチル水銀濃度と神経発達影響との関係に一貫性が認められなかった。さらに、後発の“東北コホート研究”においては、メチル水銀の増加が新生児行動評価における運動機能低下と関連したと報告されている。以上のように、これまでの出生コホート研究において、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症について統一した見解には至っていないが、低濃度のメチル水銀であっても、胎児期曝露においては影響があることが示されている。

それでは、低濃度メチル水銀の胎児期曝露における神経症状の発症誘発要因とは何なのだろうか？神経症状誘発メカニズムについては、現在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。申請者である藤村は、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症メカニズムを解明する

ため、実験動物(ラット)を用いた検討を行った。低濃度メチル水銀(0.25 mg/kg/day)の胎児期曝露によって、神経病変を誘発せずに、成体期(6週齢以降)に神経症状(協調運動障害)を発症する動物モデルを作成することに成功した。ラットを用いた動物実験において、メチル水銀の胎児期曝露は、1 mg/kg/day以上で神経病変を伴う神経症状を生じるが、本モデルの場合、より低濃度(0.25 mg/kg/day)で神経病変を伴わずに神経症状を発症させることができた。さらに本モデルにおいて詳細な組織学的検討を行った結果、一般的な神経病変(神経細胞死およびグリオシス等)は観察されなかったが、免疫組織染色を用いたシナプス構成蛋白質の観察によって、協調運動障害の責任部位である小脳の顆粒細胞(CGCs)にシナプス形成不全(シナプス構成因子である Synaptophysin の発現低下)が生じることを見出し、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症に小脳のシナプス形成不全が関与していることを示唆することができた(Fujimura et al., Brain Res., 2012)。

現在、このシナプス形成不全の原因因子を明らかにするため、メチル水銀曝露によって変化する小脳蛋白質について mass spectrum を用いた解析を行い、神経突起形成およびシナプス形成に關与する elongation factor 1a を候補因子の一つとして絞り込んでいる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで解明されていない低濃度メチル水銀の胎児期曝露における神経症状誘発因子を明らかにし、メチル水銀中毒の診断、予防および治療において有益な

情報を得ることである。

### 3. 研究の方法

低濃度メチル水銀の胎児期曝露によって神経病変(神経細胞死およびグリオシス等の一般的な神経病変)を誘発せずに神経症状を呈する動物モデルを用いて、各種脳内 mRNA および蛋白質の変動を解析し、低濃度メチル水銀曝露における神経症状誘発要因の候補因子を推定する。さらに、神経前駆細胞等の発達段階の培養神経細胞(神経前駆細胞)を用いて、より詳細に神経症状誘発因子(神経形成抑制因子)についての探究を行う。以上の検討によって、これまで解明されていない低濃度メチル水銀の胎児期曝露における神経症状誘発因子を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 低濃度メチル水銀の胎児期曝露モデルを用いた神経症状誘発因子の探究

ラットを用いて、神経細胞死を引き起こさない低濃度メチル水銀の胎児期曝露(母体への 5 ppm メチル水銀水の飲水投与)が生後の小脳において神経突起伸展を抑制し、シナプス蛋白質の発現を減弱させることを明らかにした。さらに、これらの神経形成への影響は、神経発達に重要な役割を果たしている TrkA 経路の活性化および伸展因子である eEF1A の発現を胎児期にメチル水銀が抑制することで生じていることが示唆された。以上の結果より、低濃度(5 ppm)メチル水銀の胎児期曝露は、神経細胞死を引き起こさないものの、TrkA 経路の活性化および eEF1A の発現を抑制し、生後の神経突起伸展およびシナプス蛋白発現に影響すると考えられた。

#### (2) 発達段階の培養神経細胞を用いた神経症状誘発因子(神経形成抑制因子)の探究 神経細胞の元となる神経前駆細胞を用いて

解析した結果、神経前駆細胞の増殖が、神経細胞死を引き起こさない低用量のメチル水銀(10 nM)で抑制されることを明らかにした。さらに、この神経幹細胞の増殖抑制作用は、メチル水銀が GSK-3 $\beta$  を発現誘導し、細胞周期に関係する Cyclin E という蛋白質を分解することで生じていることも明らかになった。また、GSK-3 $\beta$  を阻害するリチウムがこのメチル水銀による神経幹細胞の増殖抑制を防ぐことがわかった。以上の結果は、低用量メチル水銀の胎児期における神経形成への影響が神経幹細胞の増殖を抑制した結果であり、このメチル水銀による増殖抑制作用が GSK-3 $\beta$  を阻害する薬によって予防可能であることを示すものである。

### 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3件)

- (3) Fujimura M, Usuki F, Cheng J, Zhao W: Prenatal low-dose methylmercury exposure impairs neurite outgrowth and synaptic protein expression and suppresses TrkA pathway activity and eEF1A1 expression in the rat cerebellum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 298, 1-8 (2016).
- (2) Cheng J, Fujimura M, Bo D: Assessing pre/post weaning neurobehavioral development for perinatal exposure to low doses of methylmercury. *J. Environ. Sci. (China)*, 38, 36-41 (2015).
- (1) Fujimura M, Usuki F: Low concentrations of methylmercury inhibit neural progenitor cell proliferation associated with

up-regulation of glycogen synthase kinase 3 and subsequent degradation of cyclin E in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 288, 19-25 (2015).

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

〔学会発表〕(計3件)

- (3) Fujimura M, Usuki F: Perinatal exposure to low-dose methylmercury results in neuritic hypoplasia and change of synaptic homeostasis through the suppression of TrkA pathway and subsequent expression of eEF1A1 in rat brain. 第38回日本分子生物学会年会, (2015).
- (2) 藤村成剛, Cheng J, Zhao W: メチル水銀の胎児期曝露による小脳神経シナプス形成におよぼす影響. 第42回日本毒性学会学術年会, (2015).
- (1) Fujimura M, Usuki F: Low level of methylmercury inhibits cell proliferation through the activation of glycogen synthase kinase 3 and subsequent degradation of cyclin E in cortical progenitor cells of rats. 54th Society of Toxicology, (2015).

〔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