

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550043

研究課題名(和文)有機ヒ素化合物による小脳症状と小脳内miRNA発現調節異常の因果

研究課題名(英文)Organic arsenicals induced cerebellar symptoms and disturbance of miRNA regulation

研究代表者

根岸 隆之(Negishi, Takayuki)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80453489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：茨城県神栖市で発生した地下水ヒ素汚染事故で検出された有機ヒ素化合物の一つであるジフェニルアルシン酸(DPAA)による神経症状発症メカニズムとして培養アストロサイトの異常活性化(細胞増殖、MAPキナーゼと転写因子の活性化、脳内サイトカイン(MCP-1、adrenomedullin、CXCL1、IL-6)の放出)を明らかにした。続いて、上記の4種類のサイトカインがmiR-181という同じmiRNAにより発現が抑制され得ることに注目し、miR-181発現量を半定量したところ、DPAAにより発現量が減少したが、miR-181の減少は少なくとも上記のアストロサイトの活性化に直接は関与していなかった。

研究成果の概要(英文)：In the arsenic poisoning occurred in Kamisu, Ibaraki, Japan, people drinking highly arsenic-contaminated water of the well suffered from neurological, mainly cerebellar, symptoms. Exposure to diphenylarsinic acid (DPAA), a compound detected in the Kamisu accident, was able to induce abnormal behaviors in rats in vivo and activation of astrocytes (cell proliferation, activation of MAP kinase and transcription factors, and release of MCP-1, adrenomedullin, CXCL1, and IL-6). Here, the role of miRNA, which negatively regulates transcription of these cytokines, miR-181, was investigated. DPAA, which was a main and most active organic arsenicals among those found in the Kamisu accident, reduced miR-181 expression at 10⁻⁸M after 96 hour exposure in cultured astrocytes. However, interference using miRNA mimic and miRNA inhibitor specific for miR-181 showed little effect. It seemed that reduction of miR-181 hardly account for DPAA-induced activation of astrocytes.

研究分野：神経毒性学

キーワード：有機ヒ素化合物 酸化ストレス miRNA 小脳症状 アストロサイト ラット

1. 研究開始当初の背景

茨城県神栖市で 2003 年に発生した地下水ヒ素汚染事故では、5 価の有機ヒ素化合物が検出された。この事故ではヒ素汚染水を生活用水として利用していた住民が小脳症状を主徴とする神経症状を訴えた。逆にこの突如集団に発生した神経症状が地下水のヒ素汚染と汚染源確定を早めた。事故から 12 年が経過したが、症状自体は軽微ながらも頭痛を訴える住民もいる。研究代表者は事故で検出された数種類の有機ヒ素化合物の中でもジフェニルアルシン酸 (DPAA) について、中枢神経系の中でも小脳に注目して DPAA が小脳症状を引き起こすメカニズムの解明を目指してきた。具体的には初代培養ラット小脳神経系細胞において DPAA 曝露を行い、網羅的遺伝子発現解析からの定量的遺伝子発現解析を行い DPAA による酸化ストレス応答遺伝子および「神経・血管作動性ペプチド (MCP-1/CCL2、Adrenomedullin、CXCL1、FGF-2) の発現上昇」を明らかにした。次いで免疫細胞化学染色によりこれらのペプチドを産生する細胞種の同定を試みたところ、酸化ストレス応答因子を含め上記 4 ペプチドは全て神経細胞ではなくアストロサイトが発現していた。これらの変化は DPAA 曝露した生体ラットの脳でも観察された。さらに生後直後より実際の事故に近い濃度で DPAA を曝露したラットはオープンフィールドテストにおいて可逆的に多動行動を示し、また非可逆的に記憶・学習障害を示した。このように *in vitro* および *in vivo* を適切に組み合わせることで DPAA による小脳症状発症のメカニズム解明を目指し、「DPAA によるアストロサイトの活性化 (細胞増殖、MAPキナーゼの活性化等) とサイトカインの過剰放出が小脳症状や脳血流異常の原因である」という仮説を立てるに至った。ところで、DPAA がこれだけの遺伝子発現をかく乱させるメカニズムについては未だ不明である。ヒ素化合物なので酸化ストレスが生じ、酸化ストレス応答因子が誘導されるのは容易に想像できる。しかしながら、なぜ MCP-1/CCL2、Adrenomedullin、CXCL1、FGF-2 といった脳内サイトカインが同時に産生されるのかは不明である。さらに、詳細は省くが DPAA による酸化ストレスがアストロサイトの活性化に直接的に関与するとは言い難い結果ばかり得られている (未発表)。アストロサイトは十分に抗酸化ストレスシステムを備えていた。そんななか、特に根拠なく近年注目されている遺伝子発現制御システムである miRNA について気になり、今回の実験系で DPAA による異常放出が確認されている MCP-1/CCL2、Adrenomedullin、CXCL1、FGF-2 の発現を抑制すると予想される miRNA をデータベース上で眺めたところ FGF-2 をのぞく MCP-1/CCL2、Adrenomedullin、CXCL1 の 3 種のペプチドは共通して miR-181 により制御をうけると推定されていた。しかるに、DPAA

による miR-181 の発現抑制がこれらサイトカインの発現や、延いてはアストロサイトの活性化の原因ではないか、という思いに至り、本研究課題を遂行した。

2. 研究の目的

DPAA によるアストロサイトの異常活性化、さらには MCP-1/CCL2、Adrenomedullin、CXCL1 等の脳内サイトカインの異常放出における miRNA 発現制御の関与を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では主にラット小脳由来培養アストロサイトにおける DPAA とその関連有機ヒ素化合物の影響を評価した。新生仔 Wistar ラット小脳から初代培養を準備し、それを長期培養と継代を繰り返すことで増殖性の高いアストロサイトから成る培養系を調整した。増殖用の培養液は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 含有 DMEM/F-12 を用いた。続いて最終継代時に 500 個/mm² で播種し、48 時間後に無血清培養液 (DMEM/F-12+Insulin+Transferrin+Selenium) に交換し、さらに 48 時間追加培養を行った (無血清馴化)。続いて、DPAA やその他の薬剤を溶解した無血清培養液と交換することで薬物処置を行った。miR-181 の発現に関してはサーモフィッシャー社 (Applied Biosystems 社) の推奨方法に従い特異的プライマーを用いた逆転写および TaqMan プローブを用いた real-time PCR を行い定量した。miR-181 の mimic や inhibitor はサーモフィッシャー社の mirVana Mimics & Inhibitors より入手して推奨方法に従い使用した。その他、培養液中のサイトカイン濃度測定も市販の ELISA キットを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 有機ヒ素化合物によるアストロサイトの活性化についての構造活性相関解析

この化合物が問題となったヒ素汚染事故で DPAA と同時に検出された有機ヒ素化合物であるフェニルアルソン酸 (PAA)、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA)、フェニルジメチルアルシンオキド (PDMAO)、およびジフェニルメチルアルシンオキド (DPMAO) についても影響を検証したところ、アストロサイトへの影響は DPAA が最も強く、PMAA がわずかに影響を与える程度、他の三種は全く影響を与えなかった。この結果より、今後はこのヒ素汚染事故の実態を考察するためには DPAA 一本で検証することが必要十分であることを明らかにした。この研究成果は米国毒性学会機関紙「Toxicological Sciences」に報告した (雑誌論文)。

(2) miR-181 発現における DPAA の影響

miR-181 の経時的な発現量解析により、培養アストロサイトにおいて miR-181 の発現は

培養時間に応じて発現上昇するが DPAA によりその発現上昇が抑制されていることと発現抑制は DPAA ばく露 96 時間後によりやく顕著になることが明らかとなった。

(3) miR-181 発現制御と DPAA によるアストロサイトの活性化

DPAA によるアストロサイトの活性化における miR-181 の関与を検証するために miR-181 の mimic RNA と inhibitor RNA の効果を、DPAA ばく露時の形態変化、細胞増殖、およびサイトカイン産生等を指標として評価したが、特段の効果は見られなかった。この点については様々な角度から評価を行ったが、miR-181 への干渉が DPAA と類似の影響を見せることも無く、DPAA による活性化の程度を変化させることも無かった。つまり、DPAA により miR-181 の発現が抑制されるが、DPAA によるサイトカインの異常産生への道においてこの経路が決定的に関与しているとは考えがたい。

本研究では結果として DPAA による特定の miRNA 制御の破綻がアストロサイトの活性化を直接支配するという強い仮説を否定するに終わったが、miR-181 は脳内で比較的豊富に発現している miRNA であり、DPAA によるその発現抑制は今回評価したサイトカイン以外の遺伝子の発現の調節に影響を与える可能性がある。直接的因果は見いだせなかったが、解析を進めるにあたってこれまで以上に DPAA がアストロサイトを活性化させるメカニズムに踏み込むことができた。何よりも、miRNA 発現制御の評価・解析のために得たスキルは研究代表者がこれまでもこれからも行う「化学物質が脳発達に与える影響」を評価する際に重要な戦力となると考える。

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 6 件)

Negishi T, Matsumoto M, Kojima M, Asai R, Kanehira T, Sakaguchi F, Takahata K, Arakaki R, Aoyama Y, Yoshida H, Yoshida K, Yukawa K, Tashiro T, Hirano S. Diphenylarsinic Acid Induced Activation of Cultured Rat Cerebellar Astrocytes: Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinases, Upregulation of Transcription Factors, and Release of Brain-Active Cytokines. *Toxicol Sci*. 査読有. 2016 Mar;150(1):74-83. doi: 10.1093/toxsci/kfv310.
Oyanagi K, Tashiro T, Negishi T. Cell-type-specific and differentiation-status-dependent variations in

cytotoxicity of tributyltin in cultured rat cerebral neurons and astrocytes. *J Toxicol Sci*. 査読有. 2015 Aug;40(4):459-68. doi: 10.2131/jts.40.459.

Oyanagi K, Negishi T, Tashiro T. Action of thyroxine on the survival and neurite maintenance of cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci Res*. 査読有. 2015 Apr;93(4):592-603. doi: 10.1002/jnr.23519.
Semaphorin 4D induces vaginal epithelial cell apoptosis to control mouse postnatal vaginal tissue remodeling. Ito T, Bai T, Tanaka T, Yoshida K, Ueyama T, Miyajima M, Negishi T, Kawasaki T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A, Yukawa K. *Mol Med Rep*. 査読有. 2015 Feb;11(2):829-36. doi: 10.3892/mmr.2014.2773.

Altered social interactions in male juvenile cynomolgus monkeys prenatally exposed to bisphenol A. Negishi T, Nakagami A, Kawasaki K, Nishida Y, Ihara T, Kuroda Y, Tashiro T, Koyama T, Yoshikawa Y. *Neurotoxicol Teratol*. 査読有. 2014 Jul-Aug;44:46-52. doi: 10.1016/j.ntt.2014.05.004.

Estrogen-dependent proteolytic cleavage of semaphorin 4D and plexin-B1 enhances semaphorin 4D-induced apoptosis during postnatal vaginal remodeling in pubescent mice. Ito T, Bai T, Tanaka T, Yoshida K, Ueyama T, Miyajima M, Negishi T, Kawasaki T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A, Yukawa K. *PLoS One*. 査読有. 2014 May 19;9(5):e97909. doi: 10.1371/journal.pone.0097909. eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 9 件)

水野 智博、水野 彩花、高橋 和男、吉岡 憲吾、辰川 英樹、松本 真実、根岸 隆之、湯澤 由紀夫、人見 清隆、永松 正、エペロリムスは、腎がん細胞にて組織トランスグルタミナーゼ発現を低下させる。、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜
飯田 耕太郎、大津 史子、北垣 伸治、長谷川 洋一、早川 伸樹、田口 忠緒、井藤 千裕、伊東 亜紀雄、加藤 美紀、小島 良二、杉浦 道治、武田 直仁、植田 康次、近藤 啓太、根岸 隆之、平松 正行、ICT を活用し薬学領域の基盤学力の向上を目指した自己学習支援プログラムの開発と教育実践(第 2 報) 正文・誤文問題集の導入とその有用性の検討、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜
根岸 隆之、浅井 椋大、金平 朋子、小嶋 幹也、阪口 文香、高畑 和明、青山 洋平、新垣 梨奈、松本 真実、吉田 光、吉田 謙二、湯川 和典、田代 朋子、平野 靖史郎、

培養小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレス、MAPキナーゼ活性化、および神経・血管作動性サイトカイン産生、第21回ヒ素シンポジウム、2015年11月14日、徳島文理大学 国際会議場 (21号館2階) (徳島市山城町西浜忘傍示180)

根岸 隆之、浅井 椋大、阪口 文香、高畑 和明、金平 朋子、小嶋 幹也、青山 洋平、松本 真実、新垣 梨奈、吉田 光、吉田 謙二、湯川 和典、田代 朋子、平野 靖史郎、培養小脳アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸と関連有機ヒ素化合物による酸化ストレス、MAPK活性化、および神経・血管作動性ペプチド異常放出の構造活性相関、第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、神戸国際会議場

根岸 隆之、浅井 椋大、金平 朋子、小嶋 幹也、阪口 文香、高畑 和明、青山 洋平、新垣 梨奈、松本 真実、吉田 光、吉田 謙二、湯川 和典、田代 朋子、平野 靖史郎、ラット小脳由来アストロサイトにおけるジフェニルアルシン酸によるMAPKの活性化とグルタミン酸の放出、第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月30日、石川県立音楽堂他

小柳 洸志、根岸 隆之、田代 朋子、培養小脳顆粒細胞の低カリウム誘発細胞死モデルにおけるサイロキシンの細胞生存および神経突起維持効果、第57回日本神経化学学会大会、2014年9月30日、奈良県

根岸隆之、松永友貴、高橋理貴、平野靖史郎、田代朋子、ジフェニルアルシン酸ばく露による行動異常と小脳アストロサイトにおける神経・血管作動性ペプチドの異常放出、第20回ヒ素シンポジウム、2014年12月6日、千葉科学大学

伊藤 卓治、吉田 謙二、根岸 隆之、湯川 和典、プレキシン A1 は Toll 様受容体を介するミクログリアの活性化に必要とされる、第37回日本神経科学大会 (Neuroscience 2014)、2014年9月13日、パシフィコ横浜

根岸 隆之、カニクイザルを用いた化学物質の発達神経毒性評価、第41回日本毒性学会学術年会 ミニシンポジウム 1、2014年7月2日、神戸、神戸コンベンションセンター(国際会議場・国際展示場)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

根岸 隆之 (NEGISHI, Takayuki)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80453489

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：