

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740024

研究課題名(和文)メチル水銀による酸化ストレス誘導メカニズムの解明とそのin vivo神経影響評価

研究課題名(英文)The mechanism of generation of reactive oxygen species and oxidative neuronal injury induced by methylmercury

研究代表者

石原 康宏 (Ishihara, Yasuhiro)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：80435073

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)：本研究では、メチル水銀が惹起する酸化ストレスによって生じる脳機能障害のメカニズムの解明を目指した。神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞由来のミトコンドリア欠損細胞を用いた解析により、メチル水銀による神経毒性にはミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)が関与することが示された。また、メチル水銀投与マウスにおいて、脳部位特異的な酸化が検出された。今後、部位特異的に産生するROSと行動異常との相関を解析したい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the mechanism of oxidative neuronal injury induced by methylmercury. Reactive oxygen species (ROS) derived from mitochondria were shown to be involved in neurotoxicity induced by methylmercury using mitochondrial DNA depleted SH-SY5Y cells. Brain region specific oxidation was detected in mice administered with methylmercury. The relationships between region specific generation of ROS and behavior disorder induced by methylmercury will be examined in the future.

研究分野：環境毒理学

キーワード：メチル水銀 活性酸素 酸化ストレス ミトコンドリア MRI

1. 研究開始当初の背景

水銀は、電池、蛍光灯や防腐剤など、産業的、医学的に広く用いられてきた。水俣病の発生以後規制が強化されたが、日本では未だに年間 13 トン (2006 年環境省) が使用されている。加えて、大気中へ年 22~31 トン、公用水域へ年 0.33 トン以上を排出しており (平成 21 年度有害金属対策基礎調査検討会、環境省) 水銀による環境汚染はまだ続いている。海洋へ排出された無機水銀は、微生物によりメチル水銀へ変換され (Nat Geosci 6:879) メチル水銀は海洋生物の体内で高度に濃縮される。従って、メチル水銀のヒトへの影響は、魚介類を多く摂取する日本人にとって重要な問題であり、厚生労働省は、2005 年、『妊婦への魚介類の摂取と水銀に関する注意事項』を公表し、メチル水銀の摂取に注意を促している。

経口摂取したメチル水銀は、システインと結合し、消化管より吸収される。このメチル水銀-システイン複合体は血液脳関門を容易に通過し、運動機能障害や知覚障害を引き起こす。従って、メチル水銀の神経系への影響は、水銀毒性理解のための中心課題である。

酸化ストレスは、メチル水銀による神経障害の主要なメカニズムである (Brain Res 1131:1; Mol Brain Res 137:11) 申請者らも、メチル水銀による神経障害を報告し (Plos One 8: e55559) また、メチル水銀により酸化ストレスが生じることも確認した。しかし、酸化ストレスがメチル水銀の主要な毒性メカニズムであると認識されているにも関わらず、メチル水銀がどのようなメカニズムで活性酸素種 (ROS) を生成するのかについては、報告も少なく、議論がある。その原因として、メチル水銀のような低分子化合物は、細胞内動態の解析が困難であることが挙げられる。また、惹起された酸化ストレスが *in vivo* でどのように作用するかについては、研究技術が限定されているため、報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 培養細胞を用い、メチル水銀による ROS 生成メカニズムを明らかにし、(2) メチル水銀暴露マウスを使用し、メチル水銀により惹起される酸化ストレスと、高次脳機能障害との関連を *in vivo* で解析する、ことによって酸化ストレスに端を発するメチル水銀神経毒性の全体像の解明を目指す。

3. 研究の方法

メチル水銀による神経毒性におけるミトコンドリアの役割を明らかにするために、神経芽腫細胞株 SH-SY5Y からミトコンドリア

欠損細胞 (ρ^0 細胞) を作製した。 ρ^0 細胞をメチル水銀で処置したときの ROS 生成量やメチル水銀に対する感受性を調べ、メチル水銀毒性におけるミトコンドリアの役割を検討した。

次に、メチル水銀を投与したマウスの運動機能をロータロッドにより評価した。さらに、脳内酸化状態を、3-ヒドロキシメチルプロキシル (3HMP) を造影剤として用いた核磁気共鳴画像 (MRI) 法により画像化し、画像を解析することにより、脳部位ごとの酸化状態を算出した。これらの結果より、メチル水銀による脳内酸化と高次脳機能について考察した。

4. 研究成果

(1) メチル水銀による酸化ストレスと細胞障害におけるミトコンドリアの関与

神経芽腫細胞株 SH-SY5Y を 0.5 μ g/mL 臭化エチジウム (EtBr) (0.5EtBr と表記) および、2 μ g/mL EtBr (2EtBr と表記) の存在下で 60 日間培養し、 ρ^0 細胞を作製した。SH-SY5Y 細胞は、EtBr 濃度依存的にミトコンドリア DNA を欠失することが明らかとなった (図 1)。また、作製した ρ^0 細胞は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (チトクロム c 酸化酵素) の発現が大きく減少しており (図 2)、その活性も低下していた。さらに、酸素消費量も減少した (図 3)。これらの結果より、ミトコンドリア機能が大きく欠失している ρ^0 細胞を SH-SY5Y 細胞から作製することができたと判断した。

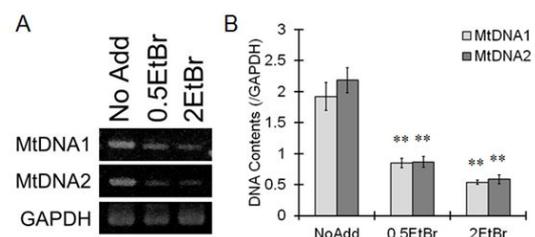


図 1. EtBr 処置によるミトコンドリア DNA の欠失

細胞から DNA を抽出し、ミトコンドリア特異的プライマー (MtDNA1、MtDNA2) を用いてミトコンドリア DNA を検出した (A)。また、得られた DNA バンドを Image J により定量した (B)。

次に、作製した ρ^0 細胞をメチル水銀で 24 時間処置し、LDH 法により細胞生存率を測定した (図 4)。SH-SY5Y 細胞はメチル水銀濃度に依存して細胞死が増加し、1 μ M メチル水銀により 41%、10 μ M メチル水銀により 98% の細胞が障害を受けた。一方、 ρ^0 細胞は、1 μ M メチル水銀処置では細胞死が生じなかった。従って、 ρ^0 細胞はメチル水銀に対して耐性を有していることが明らかとなった。背景の項でも述べたが、メチル水銀による細胞

障害の機序として、酸化ストレスが考えられている。そこで、次に、 ρ^0 細胞をメチル水銀で処置したときの ROS 生成量を測定した。

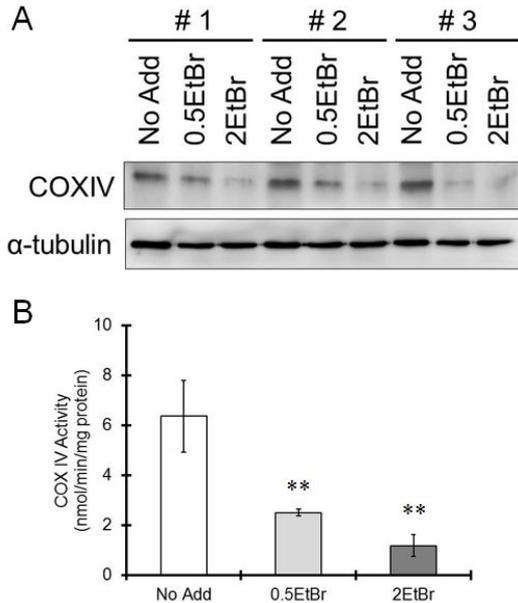


図 2. EtBr 処置によるチトクロム c 酸化酵素の発現と活性の低下

細胞を可溶化した後、ウエスタンブロットによりチトクロム c 酸化酵素サブユニットの発現を測定した (A)。ミトコンドリアを単離・精製し、チトクロム c を基質としてチトクロム c 酸化酵素の活性を測定した (B)。

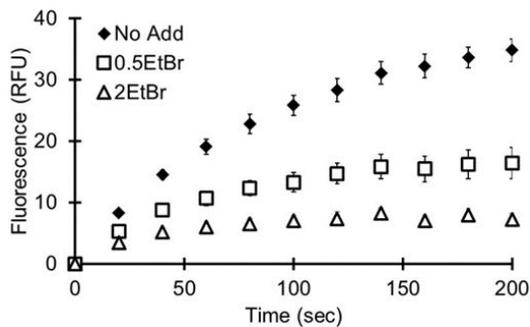


図 3. EtBr 処置による細胞の酸素消費量の低下

細胞の酸素消費量を、酸素が存在するとリン光を発する酸素検出プローブ MitoXpress を用いて測定した。

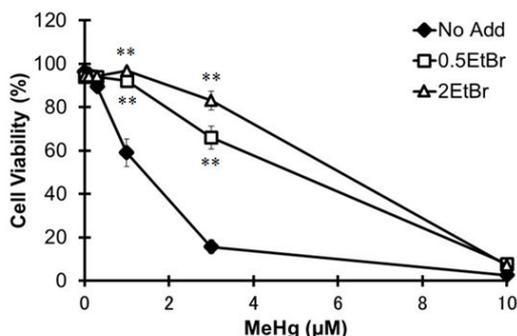


図 4. ρ^0 細胞のメチル水銀耐性

細胞を様々な濃度のメチル水銀で 24 時間処置した後、LDH 法により細胞生存率を測定した。

細胞をメチル水銀で処置したのち、ROS 感受性蛍光色素である $H_2DCF-DA$ を用いて細胞内 ROS を測定したところ (図 5)、SH-SY5Y 細胞を $1\mu M$ メチル水銀で処置すると、細胞内 ROS 量が増加することが明らかとなった。一方、SH-SY5Y 細胞を $10\mu M$ メチル水銀で処置しても、細胞内 ROS に変化は見られなかった。興味深いことに、 ρ^0 細胞をメチル水銀で処置したとき、DCF に由来する蛍光の上昇は全く観察されず、従って、メチル水銀は ρ^0 細胞に酸化ストレスを惹起しないことが明らかとなった。

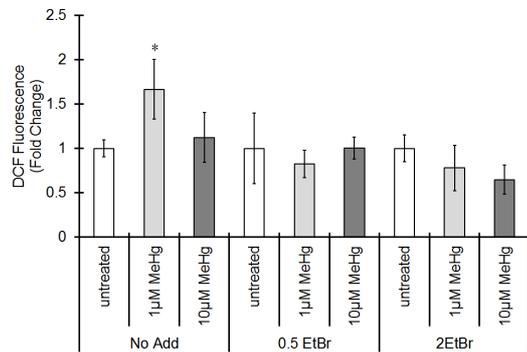


図 5. メチル水銀処置による細胞内 ROS 量の変化

細胞をメチル水銀で処置した後 30 分間培養した。 $H_2DCF-DA$ を添加後、DCF 由来の蛍光を測定し、数値化した。

以上の結果より、低濃度 ($1\mu M$) のメチル水銀は神経細胞に酸化ストレスを誘導し、その結果、細胞死が生じることが明らかとなった。 $1\mu M$ メチル水銀は、 ρ^0 細胞には酸化ストレス、細胞死共に引き起こさなかったことから、低濃度メチル水銀処置時の ROS 生成源はミトコンドリアであることが示唆される。高濃度 ($10\mu M$) メチル水銀で SH-SY5Y 細胞と ρ^0 細胞を処置しても、細胞内 ROS 量の増加は認められなかったことから、高濃度メチル水銀により引き起こされる細胞死には酸化ストレスは関与しないと考えられる。メチル水銀はタンパク質合成の阻害 (J Neurochem 44:1799) やマイクロチューブの脱重合 (J Toxicol Sci 23:379) を引き起こすことから、細胞が高濃度メチル水銀に曝されると、上記のような酸化ストレスに依存しないメカニズムで細胞死が生じるのかもしれない。

(2) MRI を用いたメチル水銀投与マウスの脳内酸化測定の試み

私たちは 3HMP を造影剤として用いた MRI 法により、アルツハイマー病モデルマウス (3xTg AD マウス) の脳内酸化測定に成

功している (Free Radic Res. 47:731)。そこで、この測定法を用い、メチル水銀投与とマウスの脳内酸化状態の画像化を目指した。

雄性 ICR マウスに 4mg/kg/day の用量でメチル水銀を経口投与し、ロータロッドで運動機能を測定した (図 6)。マウスのロータロッド上の滞在時間は、投与 4 週間までは変化が認められなかったが、投与 5 週後に滞在時間が短縮する傾向が表れ、投与 6 週後からロータロッド上の滞在時間が有意に短縮した。本研究では、メチル水銀による障害の表現型が現れる前の脳内変化を捉えることを目的としているため、メチル水銀投与 3 週間後のマウスの脳内酸化を測定することとした。

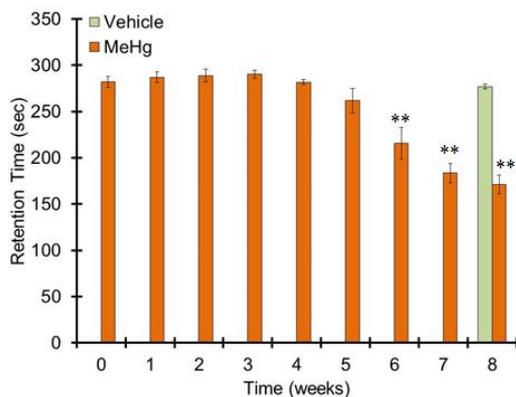


図 6. メチル水銀によるマウス運動機能の変化

雄性 ICR マウスに 4mg/kg/day の用量でメチル水銀を経口投与した。ロータロッドにより、継時的に運動機能を測定した。

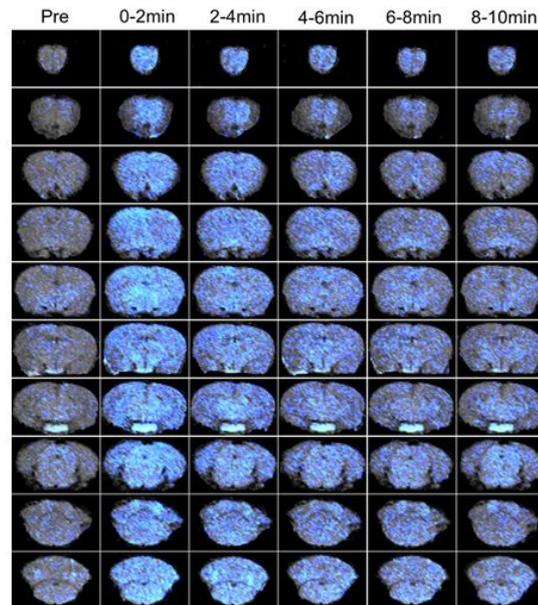
メチル水銀を 3 週間投与したマウスに 1 μ mol/kg の用量で 3HMP を尾静脈から投与した。直ちに、1mm 厚の脳内 T1 強調画像 (2 回積算) を計 10 分間撮像した (図 7)。3HMP は、還元状態で T1 によるコントラストを生じるため、脳内酸化されるほど T1 シグナルが低下する。

得られた画像について、脳部位 (大脳皮質運動野、大脳皮質視覚野、大脳皮質体性感覚野、視床、視床下部、線条体、黒質、扁桃体、海馬、下丘、小脳) ごとのシグナル強度を解析した結果、メチル水銀投与マウスにおいて、大脳皮質運動野、大脳皮質体性感覚野、大脳皮質聴覚野、および、海馬でシグナル強度が減少していることが明らかとなった。従って、メチル水銀は、脳内酸化を引き起こすこと、さらに、酸化の程度は脳部位ごとに異なることが明らかとなった。

ロータロッドは協調運動障害を評価する試験であり、その責任部位は主に小脳である。しかし、末梢神経が障害された場合もロータロッドの成績が低下する。従って、本研究で確認された運動機能障害と脳内酸化との関連については、末梢も含めた検討が必要であろう。さらに、私たちは、メチル水銀投与マウスの表現型として、聴覚障害が生じること

を明らかにしている。従って、蝸牛で感知した聴覚刺激を大脳皮質聴覚野に伝える聴覚伝導路の一部が障害を受けていると考えられる。上述のように、大脳皮質聴覚野はメチル水銀により強く酸化されていることから、聴覚異常と脳内酸化との関連も調べられるべきである。

Vehicle



4 mg/kg/day MeHg, 3 weeks

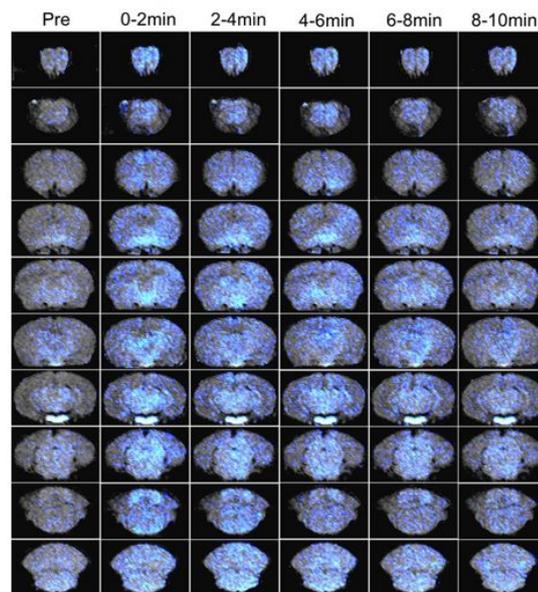


図 7. 3HMP による脳内酸化状態の画像化

メチル水銀を 4mg/kg/day の用量で 3 週間経口投与した。3HMP を尾静脈から投与した後、T1 強調画像を撮像した。

本研究では、神経細胞由来のミトコンドリア欠損細胞を用いた in vitro 系、メチル水銀投与マウスを用いた in vivo 系の双方からメチル水銀により引き起こされる酸化ストレスの発生機序と役割を検討した。メチル水銀は、ミトコンドリアからの ROS 産生を誘導

すること、ミトコンドリア由来の ROS が神経細胞死を引き起こすことを明らかにした。また、メチル水銀は、行動異常が起こる前に脳内酸化を誘導し、その酸化の程度は脳部位ごとに異なることが示された。本研究では、メチル水銀により産生される ROS の本態の一端を明らかにした。今後、部位特異的に産生する ROS と行動異常との関連付けを行い、メチル水銀による神経毒性のメカニズム解明に努めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Takemoto T, **Ishihara Y**, Tsuji M, Kawamoto T, Yamazaki T. Transcription factor activation in rat primary astrocytes exposed to methylmercury. *Fundam. Toxicol. Sci.* 3(2):63-65 (2016). (査読有)
2. **Ishihara Y**, Takemoto T, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Dual role of SOD2 induced in activated microglia: increased tolerance to oxidative stress and convergence of inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* 290(37):22805-22817 (2015). (査読有)
3. Takemoto T, **Ishihara Y**, Ishida A, Yamazaki T. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40(1):199-205 (2015). (査読有)
4. **Ishihara Y**, Takemoto T, Ishida A, Yamazaki T. Protective actions of 17 β -estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds (Review). *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015:343706 (2015). (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

1. **石原 康宏**, 竹本 拓矢, 山崎 岳. メチル水銀によるアストロサイト適応応答とその神経保護作用. 平成 26 年度 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング. 2016 年 1 月 7 日 (LMJ 東京研修センター).
2. **石原 康宏**. メチル水銀による酸化ストレス誘導メカニズムの解明とその in vivo 神経影響評価. 第 34 回 生体と金属・化学物質に関する研究会 2015 年 8 月 20 日~21 日 (木もれび (滋賀県)).
3. **石原 康宏**, 伊藤 康一, 高橋 亮平, 石田 敦彦, 山崎 岳. メチル水銀により生じる聴覚伝導路異常の解析. 第 42 回 日本毒性学会学術年会 2015 年 6 月 29 日~7 月 1 日 (石川県立音楽堂他).
4. 竹本 拓矢, **石原 康宏**, 石田 敦彦, 山崎 岳. 神経毒に対するアストロサイト適応応答のメカニズム解明. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25 日~28 日 (神戸学院大学他).

5. **石原 康宏**, 伊藤 康一, 高橋 亮平, 山崎 岳. メチル水銀の聴覚伝導路への影響. 平成 26 年度 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング. 2014 年 12 月 5 日 (LMJ 東京研修センター).
6. 竹本 拓矢, **石原 康宏**, 石田 敦彦, 山崎 岳. 神経毒に対するアストロサイトの適応応答とその神経保護作用. 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014 年 11 月 8 日~9 日 (広島国際会議場).
7. **石原 康宏**, 伊藤 康一, 高橋 亮平, 石田 敦彦, 山崎 岳. 核磁気共鳴画像法を用いたメチル水銀投与により生じる脳内酸化と神経機能異常測定を試み. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2014 年 9 月 19 日~20 日 (つくば国際会議場).
8. 竹本 拓矢, **石原 康宏**, 石田 敦彦, 山崎 岳. メチル水銀により引き起こされるアストロサイト適応応答とその神経保護作用. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー 2014 年 9 月 19 日~20 日 (つくば国際会議場).
9. 竹本 拓矢, **石原 康宏**, 石田 敦彦, 山崎 岳. メチル水銀により誘導されるラットアストロサイトの神経栄養因子放出とその神経保護作用. 第 41 回 日本毒性学会学術年会 2014 年 7 月 2 日~4 日 (神戸コンベンションセンター).

〔その他〕

1. 研究室ホームページ: <http://home.hiroshima-u.ac.jp/ishiyasu/>
2. 公開講座: “抗酸化”で健康に過ごす!? — 賢い酸素との付き合い方— グランフロント大阪 (2015 年 11 月 25 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 康宏 (ISHIHARA YASUHIRO)
広島大学・大学院総合科学研究科・助教
研究者番号: 80435073