

令和元年6月23日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02826

研究課題名(和文) 有機スズによる核呼吸因子-1低下を介した神経毒性解明

研究課題名(英文) Neurotoxicity of organotins via nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) inhibition

研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE, Yaichiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科(薬)・教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリブチルスズ(TBT)が転写因子である核呼吸因子-1(NRF-1)を抑制することを詳細に明らかにし、NRF-1発現低下の原因がNRF-1遺伝子転写調節領域の高メチル化であることを突きとめた。また、NRF-1をノックダウンするとリソソーム関連タンパク質の発現が上昇し、これはリソソーム機能が低下することにより代償的に誘導された可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機スズの神経毒性メカニズムは以前から報告されていたものの、そのメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。今回低濃度有機スズの毒性メカニズムの一端に、NRF-1という転写因子の低下が関与すること、またなぜNRF-1が低下するのかを明らかにしたことは、環境中に広く存在する化学物質の毒性を明らかにし、その毒性を抑制する方法を考える上で興味深い知見である。

研究成果の概要(英文)：We revealed details about Nuclear Respiratory Factor-1 (NRF-1) inhibition by tributyltin, and clarified that suppressed NRF-1 expression is caused by hypermethylation of the NRF-1 promoter region. NRF-1 knockdown causes compensatory induction of lysosomal proteins, probably via suppression of lysosomal functions.

研究分野：神経毒性学

キーワード：有機スズ 核呼吸因子-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

船底塗料として使用されてきたトリブチルスズ (TBT) に代表される有機スズ化合物は、環境汚染物質として認知され、哺乳動物への影響が懸念されている特定化学物質である。常在する生体内濃度と毒性を惹起する濃度が非常に近く、ヒト血液中や無処置哺乳動物の脳からも数～数十 nM の濃度で検出されている。有機スズの *in vivo* 神経毒性に関する報告は 1980～90 年代に数報の報告があるものの、それらは全て実験動物に投与して単に行動異常を調べた実験であり、有機スズ神経毒性の分子メカニズムは殆ど明らかにされていない。

核呼吸因子-1 (NRF-1) はミトコンドリア呼吸鎖を構成する一部のタンパク質発現に関与するリガンド非依存的な転写因子として発見された。神経変性疾患における発現低下は報告されているものの、NRF-1 欠損マウスは胎生致死であり、NRF-1 の機能解明は困難であった。GluR2 発現減少のみでは神経細胞死を惹起しないため、TBT の NRF-1 減少依存的な神経毒性には GluR2 も重要であるが、GluR2 以外の寄与も大きいことが予想される。

NRF-1 は GluR2 発現を正に制御する転写因子の 1 つとして報告されていることから、TBT による GluR2 発現減少に関与している可能性が考えられるが、詳細は不明である。また、GluR2 現象も含めた有機スズの神経毒性が NRF-1 活性低下により説明できる可能性が考えられる。脳は最もエネルギーを必要とする臓器であり、ミトコンドリアエネルギー産生系の阻害や異常は神経毒性を示す例が多くあるため、有機スズによる NRF-1 低下が神経毒性につながることは充分に考えられる。

2. 研究の目的

TBT による GluR2 減少の原因が NRF-1 低下によることを突きとめ、低濃度有機スズ神経毒性の鍵を握ると考えられる NRF-1 低下が何故惹起されるかを神経細胞レベルで解明する。一方、機能に未解明な点の残る NRF-1 について、NRF-1 低下が細胞機能にどのような影響を及ぼすのかを調べる。また、*in vivo* においてもこれらのメカニズムが関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 胎生 18 日齢ラット (Slc:Wistar/ST) より大脳皮質初代培養神経細胞を調製し、培養 6 日目に Ara-C を添加しグリア細胞を死滅させ、培養 11 日目まで各実験に使用した。20 nM TBT を各時間曝露後、GluR2 発現を調節する転写因子の活性を評価した。タンパク質発現量は、各種抗体を用いたウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法により評価した。mRNA 発現量はリアルタイム PCR 法により評価した。

2) ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y に 100 nM および 300 nM TBT を曝露し、WST-1 法を用いて細胞生存率を調べたところ、300 nM TBT 曝露 72 時間後において細胞生存率の低下が認められた。このときに、NRF-1 タンパク質および mRNA は共に有意に減少していた。そこで、この発現減少に TBT によるエピジェネティックな影響が関与している可能性を考え、バイサルファイトシーケンス法を用いて NRF-1 プロモーター部位のメチル化状態を調べた。

3) NRF-1 の過剰発現プラスミドを構築し、HEK293 細胞および SH-SY5Y 細胞にトランスフェクションを行い経時的に細胞を観察し、生存率その他を調べた。また、NRF-1 が制御していると報告されているシトクロム c、COX6、TFAM、TFB1M、eIF2 などの下流遺伝子発現を調べた。

4) HEK293T 細胞のゲノム DNA に NRF-1 に対する shRNA をレンチウイルスベクターにより組み込み、ピューロマイシンで導入細胞を選択後、ノックダウン効率の高い細胞を選別し、Doxycycline (Dox) 誘導性 NRF-1 ノックダウン細胞株を作製した。この細胞を用いてマイクロアレイを行い、NRF-1 をノックダウンした際に発現変動する遺伝子を調べた。

5) NRF-1 ノックダウン細胞を用いて、細胞内タンパク質を [¹⁴C]-バリン含有培地でラベルした後、non-RI バリン含有培地に置換し、培地中に放出された [¹⁴C]-バリン量と細胞内に残存する [¹⁴C]-Valine 量を液体シンチレーションカウンタにより測定した。両者の比をタンパク質分解率として算出し、リソソーム活性の指標とした。

6) *in vivo* において TBT により NRF-1 低下およびそれにより惹起される影響が起きるかどうかを調べるため、C57BL マウスに TBT を混餌投与した。マウス通常食に 10 ppm および 25 ppm TBT を混合した餌を用意し、の親に妊娠前から出産前まで餌を摂取させた生後 20 日齢のマウスと、生後すぐから親マウスを TBT 混合餌で飼育したマウスの、脳における各種タンパク質発現をウエスタンブロットおよび免疫染色により調べた。

4. 研究の成果

1) NRF-1 に加えて、Sp1、および RE1-silencing transcription factor (REST) はいずれも GluR2 遺伝子発現調節に関与する転写因子として報告されている。そこで、各転写因子活性を評価したところ、TBT 曝露により NRF-1 結合活性が特異的に低下した。また、NRF-1 二量体形成

量を評価したところ、TBT 曝露により NRF-1 二量体形成の阻害が認められた。TBT による NRF-1 発現への影響を調べたところ、NRF-1 活性低下にともなって NRF-1 発現も低下していた。これらの結果より、TBT は NRF-1 の転写活性を阻害することにより、GluR2 発現低下を引き起こすことが示唆された。

2) NRF-1 遺伝子の転写調節領域は TBT により高メチル化されていた。また、DNA methyltransferase (DNMT) や DNA 脱メチル化酵素である ten-eleven translocation (TET) の mRNA はともに変動していた。メチル化シトシン結合タンパク質のひとつである methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) 結合量の変化をクロマチン免疫沈降法により調べたところ、結合量は有意に増加していた。以上の結果より、TBT は NRF-1 プロモーター領域に対してエピジェネティックな変化を与え、これにより NRF-1 発現を減少させることが示唆される。TBT によるエピジェネティックな影響は、PPAR など肥満に対する影響のみしか報告されておらず、TBT の新たな作用解明が期待される。

3) HEK293T 細胞および SH-SY5Y 細胞に NRF-1 を過剰発現させたところ、NRF-1 mRNA およびタンパク質は過剰量発現していたにもかかわらず、予想に反して下流遺伝子の発現は抑制され、細胞死が認められた。NRF-1 発現量が過剰でも細胞に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。

4) Dox 誘導性 NRF-1 ノックダウン細胞株を取得し、NRF-1 発現量を解析したところ、100 ng/ml Dox 添加後 120 h において最も高いノックダウン効率を示した。NRF-1 ノックダウンによる細胞影響を評価するためにオルガネラの形態を観察したところ、リソソーム 特異的プローブである LysoTracker を用いた観察で、NRF-1 ノックダウンによりリソソーム数の増加が認められ、また、リソソーム膜タンパク質 LAMP1 の発現上昇も認められた。さらにリソソーム関連遺伝子の mRNA 発現量は上昇していた。

5) NRF-1 低下によりリソソーム関連遺伝子の発現上昇が認められたことから、NRF-1 がリソソームの機能に何らかの影響を与えていると考えた。リソソームは生体高分子のバルク分解に関わるオルガネラであり、長命タンパク質の分解に関与している。そこでタンパク質の分解率を評価したところ、NRF-1 ノックダウンにより長命タンパク質の分解率低下が認められた。以上の結果から、リソソームの活性低下が NRF-1 ノックダウンにより引き起こされることが示唆された。NRF-1 ノックダウンによるリソソーム遺伝子発現上昇は、リソソーム活性低下に応答したホメオスタシス機構であると考えられる。

6) ウェスタンブロットの結果、25 ppm TBT を妊娠期に摂取したマウスの大脳皮質および海馬において、NRF-1 低下により惹起されると考えられる GluR2 発現低下が認められた。この現象は、抗 GluR2 抗体を用いた免疫染色においても認められた。核における NRF-1 発現低下や転写活性低下に関するはっきりしたデータは得られなかったものの、NRF-1 低下により惹起される GluR2 低下が神経細胞脆弱化につながる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 2 件)

Fujino C, Sanoh S, Tateno C, Ohta S, Kotake Y. (2019) Coordinated cytochrome P450 expression in mouse liver and intestine under different dietary conditions during liver regeneration after partial hepatectomy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 370, 133-144. (査読有)

Ohtsuki Y, Sanoh S, Santoh M, Ejiri Y, Ohta S, Kotake Y. (2019) Inhibition of cytochrome P450 3A protein degradation and subsequent increase in enzymatic activity through p38 MAPK activation by acetaminophen and salicylate derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509(1), 287-293. (査読有)

Fujino C, Sanoh S, Tamura Y, Ishida Y, Tateno C, Ohta S, Kotake Y. (2019) Changes in bile acid concentrations in chimeric mice transplanted with different replacement indexes of human hepatocytes. *BPB Reports.*, 2(2), 29-34. (査読有)

Umeda K, Miyara, M, Ishida K, Sanoh S, Ohta S, Kotake Y. (2018) Carbofuran causes neuronal vulnerability to glutamate by decreasing GluA2 protein levels in rat primary cortical neurons. *Arch. Toxicol.*, 92, 401-409. (査読有)

Hanaoka S, Ishida K, Tanaka S, Sakamoto S, Okuda K, Sanoh S, Ohta S, Kotake Y. (2018) Tributyltin induces epigenetic changes and decreases the expression of nuclear respiratory factor-1, *Metallomics*, 10, 337-345.21 (査読有)

Takaoka N, Sanoh S, Okuda K, [Kotake Y](#), Sugahara G, Yanagi A, Ishida Y, Tateno C, Tayama Y, Sugihara K, Kitamura S, Kurosaki M, Terao M, Garattini E, [Ohta S](#). (2018) Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol.*, 154, 28-38. (査読有)

Ishida K, Tsuyama Y, Sanoh S, [Ohta S](#), [Kotake Y](#). (2017) Perfluorooctane sulfonate induces neuronal vulnerability by decreasing GluR2 expression. *Arch Toxicol.*, 91(2):885-895. (査読有)

Ishida K, [Kotake Y](#), Sanoh S, [Ohta S](#). (2017) Lead-Induced ERK Activation Is Mediated by GluR2 Non-containing AMPA Receptor in Cortical Neurons. *Biol Pharm Bull*,40(3), 303-309 (査読有)

Santoh M, Sanoh S, Ohtsuki Y, Ejiri Y, [Kotake Y](#), [Ohta S](#). (2017) Acetaminophen analog N-acetyl-m-aminophenol, but not its reactive metabolite, N-acetyl-p-benzoquinone imine induces CYP3A activity via inhibition of protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun*;486(3):639-644 (査読有)

Sakamoto S, Miyara M, Sanoh S, [Ohta S](#), [Kotake Y](#). (2017) Mild MPP⁺ exposure-induced glucose starvation enhances autophagosome synthesis and impairs its degradation. *Sci Rep*;7:46668. (査読有)

Ishida K, Saiki T, Umeda K, Miyara M, Sanoh S, [Ohta S](#), [Kotake Y](#). (2017) Prenatal Exposure to Tributyltin Decreases GluR2 Expression in the Mouse Brain. *Biol Pharm Bull*, 40(7), 1121-1124 (査読有)

Ishida K, Aoki K, Takishita T, Miyara M, Sakamoto S, Sanoh S, Kimura T, Kanda Y, [Ohta S](#), [Kotake Y](#). (2017) Low-Concentration Tributyltin Decreases GluR2 Expression via Nuclear Respiratory Factor-1 Inhibition. *Int J Mol Sci.*,18(8). pii:E1754. (査読有)

Sanoh S, Yamachika Y, Tamura Y, [Kotake Y](#), Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C, [Ohta S](#) (2017). Assessment of amiodarone-induced phospholipidosis in chimeric mice with a humanized liver, *J Toxicol. Sci.*, 42(5), 589-596. (査読有)

Mori J, Sanoh S, Kashiwagi K, Hanada H, Shigeta M, Suzuki KT, Yamamoto T, [Kotake Y](#), Sugihara K, Kitamura S, Kashiwagi A, [Ohta S](#) (2017). Developmental changes in drug-metabolizing enzyme expression during metamorphosis of *Xenopus tropicalis*, *J. Toxicol. Sci.*, 42(5), 605-613. (査読有)

Takagi M, Sanoh S, Santoh M, Ejiri Y, [Kotake Y](#), [Ohta S](#). (2016) Detection of Metabolic Activation Leading to Drug-induced Phospholipidosis in rat hepatocyte spheroids., *J Toxicol Sci.* 41, 155-64 (査読有)

Santoh M, Sanoh S, Takagi M, Ejiri Y, [Kotake Y](#), [Ohta S](#). (2016) Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A via polyubiquitination dysfunction., *Sci Rep.* 6, 21373 (査読有)

Asanagi M, Yamada S, Hirata N, Itagaki H, [Kotake Y](#), Sekino Y, Kanda Y. (2016) Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells., *J Toxicol Sci.* 41, 207-15 (査読有)

Umeda K, [Kotake Y](#), Miyara M, Ishida K, Sanoh S, [Ohta S](#). (2016) Methoxychlor and fenvalerate induce neuronal death by reducing GluR2 expression., *J Toxicol Sci.* 41, 255-64 (査読有)

Miyara M, Umeda K, Ishida K, Sanoh S, [Kotake Y](#), [Ohta S](#). (2016) Protein extracts from cultured cells contain nonspecific serum albumin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80(6):1164-7. (査読有)

Miyara M, [Kotake Y](#), Tokunaga W, Sanoh S, [Ohta S](#). (2016) Mild MPP⁺ exposure impairs

autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. J Neurochem. 139(2): 294-308 (査読有)

- ⑳ Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. (2015) Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver., Xenobiotica 45, 605-14 (査読有)
- ㉑ Sugiyama C, Kotake Y, Yamaguchi M, Umeda K, Tsuyama Y, Sanoh S, Okuda K, Ohta S. (2015) Development of a simple measurement method for GluR2 protein expression as an index of neuronal vulnerability., Toxicol Rep. 2, 450-460 (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

石田慶士, 古武弥一郎, 津山由美, 佐能正剛, 太田 茂, 第 44 回日本毒性学会学術年会、PFOS 発達期曝露はグルタミン酸興奮毒性に対する神経脆弱性を亢進させる、横浜市、2017 年 7 月 (査読無)

桑原由佳, 宮良政嗣, 坂本修一郎, 石田慶士, 徳永 航, 古武弥一郎, 太田 茂, パーキンソン病関連化学物質によるオートファジー選択的基質の核内蓄積、仙台市、2017 年 3 月 (査読無)

花岡早紀, 石田慶士, 田中早紀, 古武弥一郎, 太田 茂, 日本薬学会第 137 回年会、トリブチルスズによる局所的高メチル化を介した核呼吸因子-1 発現減少、仙台市、2017 年 3 月、ポスター発表 (査読無)

菅田和子, 石田慶士, 坂本修一郎, 古武弥一郎, 太田 茂, 第 55 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、核呼吸因子-1(NRF-1)タンパク質分解機構の解明、岡山市、2016 年 11 月 (査読無)

石田慶士, 古武弥一郎, 津山由美, 齋木崇史, 佐能正剛, 太田 茂, フォーラム 2016 衛生薬学環境トキシコロジー、PFOS による GluR2 発現低下を介した in vivo 神経毒性解析、東京都、2016 年 9 月 (査読無)

宮良政嗣, 古武弥一郎, 坂本修一郎, 石田慶士, 太田 茂, 第 38 回日本生物学的精神医学会第 59 回日本神経化学会大会合同年会、脳内在性パーキンソン病関連神経毒 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline によるオートファゴソーム分解抑制、福岡市、2016 年 9 月 (査読有)

梅田香苗, 古武弥一郎, 杉山千尋, 宮良政嗣, 石田慶士, 佐能正剛, 太田 茂, 第 43 回日本毒性学会学術年会、新規 GluR2 発現減少化学物質カルボフランによる神経毒性評価、名古屋市、2016 年 6 月 (査読無)

梅田香苗, 古武弥一郎, 杉山千尋, 宮良政嗣, 石田慶士, 太田 茂, カルバメート系農薬カルボフランによる GluR2 減少を介した神経毒性評価 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・中国四国支部学術大会、高知市、2015 年 11 月 (査読無)

梅田香苗, 古武弥一郎, 杉山千尋, 宮良政嗣, 石田慶士, 太田 茂, GluR2 発現減少を指標とする環境化学物質の神経毒性評価 フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸市、2015 年 9 月 (査読無)

石田慶士, 古武弥一郎, 青木香織, 瀧下智子, 木村朋紀, 諫田泰成, 太田 茂, 低濃度トリブチルスズによるニューロン脆弱化機構の解明、メタルバイオサイエンス研究会 2015、名古屋市 2015 年 8 月 (査読無)

石田慶士, 古武弥一郎, 青木香織, 瀧下智子, 木村朋紀, 諫田泰成, 太田 茂, 有機スズ神経毒性に關与する核呼吸因子-1 (NRF-1) 阻害機構の解明、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢市 2015 年 6 月 (査読無)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：太田 茂

ローマ字氏名：OHTA Shigeru

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究科（薬）

職名：名誉教授

研究者番号（8桁）：60160503

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。