

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：20590135

研究課題名(和文) 環境毒による神経機能障害に対するローキナーゼ阻害薬の効果に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study on effect of Rho kinase inhibitors against neurological impairment by environmental toxins

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

研究成果の概要(和文)：本研究では、主にメチル水銀による神経機能障害に対するローキナーゼ阻害薬の効果について実験を行った。ローキナーゼ阻害薬(Fasudil および Y-27632) は、ラット培養神経細胞においてメチル水銀による軸索変性およびアポトーシス細胞死を有意に抑制した。また、Fasudil は、メチル水銀中毒モデル動物においても末梢神経の神経変性および神経機能障害の指標である後肢交差を抑制した。さらに、ローキナーゼ阻害薬は無機水銀および Rotenone(パーキンソン病の原因候補物質) による軸索変性および神経細胞死についても培養神経細胞を用いた実験において有効であった。

研究成果の概要(英文)：We mainly show that inhibition of the Rho kinase pathway prevents MeHg-intoxication. 2 Rho kinase inhibitors, Fasudil and Y-27632, significantly protected against axonal degeneration and apoptotic cell death in cultured cortical neuron exposed to MeHg. Fasudil also prevented the neuronal degeneration in peripheral nerves and hind limb crossing sign in MeHg-intoxicated model rats. Furthermore, Rho kinase inhibitors were effective for axonal degeneration and cell death in cultured cortical neuron exposed to inorganic mercury or Rotenone as a candidate substance responsible for Parkinson disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	0	1,900,000
21年度	1,100,000	0	1,100,000
22年度	600,000	0	600,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学

## 1. 研究開始当初の背景

環境毒の中には脳神経系を標的器官として重篤な神経機能障害を引き起こすものがある。その環境毒とはメチル水銀、鉛、パーキンソン病外部因子説に基づく Rotenone 等である。その中でも特にメチル水銀は重篤かつ不可逆的な神経機能障害をもたらす。メチル水銀中毒の治療としては急性期における増悪予防的治療が実施された経緯がある。水銀を体内から排泄させるキレート剤、または水銀による酸化ストレスを介した神経障害を防止するための酸化防止剤である。これらの急性期処置は、その予防的効果により、それ以上の病態の進展抑制には一定の効果が確認されているが、現在、急性期患者はほぼ存在せず、問題になっているのは慢性期患者における神経障害である。上記のように神経機能障害は急性期において、その発症/進展因子を抑制することによって、それ以上の増悪を抑制することは可能であるが、慢性期に至ってしまうと、発症/進展因子の抑制による神経障害の根本治療は困難である。勿論、理学療法(リハビリテーション)によってある程度の症状改善は認められているが、一度神経障害が起こってからの薬物治療は不可能であると考えられていたことから、現在まで慢性期神経障害に対する薬物治療に関しての積極的な試みはない。

それでは慢性期の神経機能障害に対する解決策はあるのだろうか？ 水俣病患者でも短期間で死に至る劇症型患者の場合、大量のメチル水銀によって直接的に神経細胞死を生じさせたと考えられるが、比較的メチル水銀の摂取量が少なかったと考えられる慢性期患者の場合、神経機能に重要な役割を果たす神経突起(軸索)に障害が起き、神経細胞死に至っていないなくても神経機能障害が起こ

っていることが水俣病患者剖検例において示唆されている。そこで申請者等(藤村, 臼杵)はこの慢性期症状を実験的に再現するため、培養神経細胞を用いて、メチル水銀が神経細胞死を生じさせない低濃度(1  $\mu\text{M}$ )で神経突起形成/伸展抑制作用を示すことを証明した。この結果から、メチル水銀によって神経突起形成/伸展抑制が起こった後でも、神経細胞死に至っていなければ、何らかの薬物治療が神経機能障害の改善に寄与できる可能性が示された。

近年、Rho kinase 阻害作用を有する薬剤(Y-27632 および C3)が外科的障害による神経障害モデルにおいて神経突起伸展作用による神経再生作用を有することが動物実験において見いだされ、その作用が神経機能障害改善に繋がること示唆されている。申請者等(藤村, 臼杵)は更に培養神経細胞を用いて、低濃度メチル水銀による神経突起形成/伸展抑制作用に対する Y-27632 の治療効果について研究を行った。その結果、メチル水銀による神経突起形成/伸展抑制作用に対して、Y-27632 が神経突起形成/伸展の回復に有効であることを見出した。このことは、低濃度メチル水銀によって神経突起形成/伸展抑制作用がみられる状態でも、神経細胞死が生じていなければ、突起形成/伸展作用を有する Y-27632 が、その作用を介して神経機能障害を改善する可能性を示唆している。但しこの結果は、培養神経細胞を用いた結果であり、実際の神経機能障害について検証するためには、メチル水銀中毒モデル動物を用いた研究が必要である。また、本研究はメチル水銀だけではなく、他の環境中毒物質(鉛およびパーキンソン病の原因物質の疑いのある Rotenone 等)による神経機能障害にも有効である可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、環境毒による神経機能障害患者の治療を可能にするため、メチル水銀および他の環境毒による神経機能障害に対する Rho kinase 阻害薬の効果を実験的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

実験動物(ラット)にメチル水銀水を与えることによってメチル水銀中毒症状を発現させる。この時の中毒症状とはメチル水銀中毒患者で観察される運動機能障害の指標になりうる後肢交差症状、協調運動不全、および運動量減少であり、この時点で組織学的な異常(神経突起等の消失)が観察されることが以前の検討により確認されている。同時に Rho kinase 阻害薬(Y-27632 または C3)を持続投与して上記運動能異常の改善について測定する。その後解剖を行い、組織学的、生化学的測定を行う。組織学的測定では、神経細胞および神経突起(軸索)の異常について各種染色(H.E., K.B., 免疫染色等)による測定を行い、Rho kinase 阻害薬の神経組織における効果を明らかにする。また、神経より蛋白質を抽出し、Western Blotting による各種神経突起関連蛋白の定量を行い、Rho kinase 阻害薬の改善効果に関与する分子標的(蛋白質)を明らかにする。以上の研究によって、メチル水銀による神経機能障害に対する Rho kinase 阻害薬の効果およびそのメカニズムを検証する。

## 4. 研究成果

最初にメチル水銀による詳細な神経細胞

死機構について、ラット神経培養神経細胞を用いて研究を行った。低濃度(100 nM)のメチル水銀は、神経突起変性を引き起こした後、カスパーゼ経路を介するアポトーシス神経細胞死を誘発した。次にメチル水銀の神経突起への影響を検討した結果、神経軸索の指標である Tau 陽性神経突起の変性が樹状突起の指標である MAP2 陽性神経突起の変性に先行したことから、メチル水銀の作用は神経突起の中でも軸索に特異的なことが判明した。さらに神経突起形成およびアポトーシス神経細胞死を規定している Rho 蛋白について解析を行った。メチル水銀は、RhoA(神経突起収縮因子)の発現を変化させることなく、Rac1 と Cdc42(神経突起伸展因子)の発現を低下させ、特に Rac1 の低下が顕著であった。さらに、Rac1 と RhoA のメチル水銀毒性における役割をより明確にするため、siRNA を用いて Rac1 または RhoA を選択的に発現抑制し、メチル水銀による軸索変性および神経細胞死に対する影響について実験を行った。Rac1 の発現抑制はそれ自体で軸索変性および神経細胞死を引き起こし、RhoA の発現抑制はメチル水銀による軸索変性および神経細胞死を抑制した。以上の結果から、低濃度メチル水銀が Rac1 発現低下による神経軸索伸展/収縮の不均衡を引き起こし、神経軸索変性および神経細胞死を誘発していることが示唆された。

これまでの検討結果から、Rac1 の下流に存在する Rho/ROCK 経路の阻害がメチル水銀による神経軸索の不均衡を是正し、神経細胞死を抑制する可能性が考えられたことから、メチル水銀(100 nM)の神経毒性に対する Rho/ROCK 阻害剤の作用を検討した。Rho 阻害剤である C3 toxin と ROCK 阻害剤である Fasudil および Y-27632 は、ラット培養神経細胞において低濃度メチル水銀による軸索

変性およびアポトーシス細胞死を有意に抑制した。

次に、Rho kinase 阻害薬の in vivo における効果について検討した。まず、Rho kinase 阻害薬である Y-27632 について検討した。Y-27632 は通常の末梢投与によって神経組織に移行しないため、脊髄の大槽内にカニューレを設置して持続投与することを試みた。しかしながら、長期(4週間)の設置により髄膜炎が生じたため、大槽内へのカニューレ設置については断念した。そこで、末梢投与によって神経組織に移行する Rho kinase 阻害薬である Fasudil を用いて検討を行った。Fasudil(3 mg/kg/d の皮下投与)は、メチル水銀中毒モデル動物(20 ppm メチル水銀水の4週間飲水投与)における末梢神経(後根神経節、後根神経、脊髄交索路)の神経変性およびメチル水銀中毒に特有な症状である後肢交差を抑制した。以上の結果から、Rho/ROCK 経路の抑制がメチル水銀による神経軸索の不均衡を制御し、軸索変性と細胞死を抑制することが in vitro だけではなく in vivo でも示された。

また、培養神経細胞を用いてメチル水銀以外の環境毒(無機水銀、鉛、Rotenone、アミロイドβ)についても軸索変性および神経細胞死作用についての実験を行った。その結果、無機水銀と Rotenone (パーキンソン病の原因候補物質)が、メチル水銀と同様に神経細胞死に先行して Rac1 低下を伴う軸索変性を引き起こし、その作用は Rho Kinase 阻害薬によって抑制されることが明らかになった。

## 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2件)

- ① Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Rostene W, Godefroy D, Takashima A: Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1, leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology* 30, 16-22 (2009).
- ② Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S: Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250, 1-9 (2011).

[学会発表] (計2件)

- ① Fujimura M: Molecular mechanism of methylmercury-induced neurotoxicity in cerebrocortical neuron. Forum 2008: Pharmaceutical Health and Environmental Toxicology, (2008).
- ② Fujimura M: Neuritic degeneration contributes to methylmercury induced neuronal cell death. NIMD forum 2011, (2011).

[図書] (計1件)

- ① Usuki F, Fujimura M: Signal transduction systems involved in methylmercury-cytotoxicity. In: Aschner M and Ceccatelli S (ed.) *Methylmercury and neurotoxicity*, Springer Science + Business Media, Berlin, in press.

[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：

[その他]

ホームページ等

<http://www.nimd.go.jp/>

## 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

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

### (3) 連携研究者

出雲 周二 (IZUMO SHUJI)  
鹿児島大学・医学部・教授  
研究者番号：30143811