

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310047

研究課題名(和文)有機スズによるGluR2発現減少メカニズムの解明と*in vivo*神経影響評価研究課題名(英文)Organotin-induced GluR2 decrease and its *in vivo* neuronal effects

研究代表者

古武 弥一郎(Kotake, Yaichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が見出したTBTによるGluR2発現減少の*in vitro*メカニズム、およびTBT摂取によるGluR2(AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット)発現減少に基づいた*in vivo*神経影響の2点に着目し、環境に存在する濃度に近い濃度の有機スズによる神経影響の分子メカニズムの解明を試みた。その結果、TBTによるGluR2発現減少の一因として、転写因子である核呼吸因子-1(NRF-1)の活性および発現低下が関与していることが示唆された。一方、TBTを経口投与したラットの大脳皮質、海馬においてGluR2や脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現が減少傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Environmental concentration of organotins such as tributyltin is close to toxic concentration. In the present study, we examined *in vitro* mechanism of decrease of GluR2 (an AMPA type glutamate receptor subunit) and its *in vivo* effects. We clarified that tributyltin suppresses GluR2 expression by decreasing nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) activity. Whereas, in *in vivo* study, GluR2 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) decreased in the cerebral cortex and the hippocampus in tributyltin-treated rats. BDNF is a regulating factor of GluR2 expression. Taken together, GluR2 decrease-induced neurotoxicity might be one of unresolved toxicities.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線化学物質影響科学

キーワード：有機スズ グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

船底塗料等に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十 nM の濃度で検出される。有機スズの *in vivo* 神経毒性に関する報告は1980年代に数十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行動異常を調べた実験であり、有機スズの神経毒性メカニズムは殆ど明らかにされていない。一方我々は、脳に常在するより約10倍程度高い濃度のTBT(多くの報告はもっと高濃度で行われている)により惹起される細胞死に関連した分子メカニズムを報告してきた。

我々は、脳に常在する濃度付近の有機スズによる影響を調べる過程で、20 nM TBTを大脳皮質初代培養神経細胞に培養2日目から9日間曝露することによりGluR2タンパク質および mRNA が持続的に減少することを報告した。(この条件では全体の9割以上の遺伝子発現が変動していないことを確認している) GluR2はグルタミン酸受容体の1種であるAMPA受容体を構成するサブユニットであり、平常時に細胞内へのカルシウム流入を阻止する役割を担う。つまり、GluR2を含むAMPA受容体はカルシウム透過性が低い一方、GluR2を含まないAMPA受容体はカルシウム透過性が高いため、GluR2発現減少は神経細胞を脆弱にし、細胞死が起こりやすくなる(GluR2発現減少のみでは細胞死は起こらないが、弱い刺激により細胞死が起こるようになる)ことが知られている。また、GluR2発現減少は虚血性神経細胞死を増悪させることも報告されている。これらの結果から、脳に常在する濃度付近のTBTがGluR2発現減少により神経細胞を脆弱にし、脳虚血時に起こる神経細胞死の危険因子となる可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、TBTによるGluR2発現減少メカニズム (*in vitro*)、およびTBT摂取によるGluR2発現減少に基づいた神経影響 (*in vivo*) の2点に着目した。*In vitro*

で1の詳細なメカニズムを検討するとともに、*in vivo* で2の有機スズを含む飼料から摂取されたTBTの脳内量を定量し、GluR2発現減少およびその及ぼす影響をメカニズムに基づいた *in vivo* 神経毒性評価系を用いて明らかにする。TBT以外の有機スズについても同様のメカニズムによる神経影響を検討し、環境に存在する濃度に近い濃度の有機スズによる神経影響の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

3-1. GluR2 発現減少メカニズムの解明

GluR2 遺伝子上流には転写促進因子として Sp-1、核呼吸因子-1 (Nuclear Respiratory Factor-1, NRF-1) が、転写抑制因子として REST が結合することが報告されている。そこで、これらの転写因子が有機スズによる GluR2 発現減少に関与するか否かを、ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いて検討を行った。

3-2. In vivo 影響評価

GluR2 発現減少が惹起する *in vivo* 神経影響を調べる目的で、ラットに 5 mg/kg および 10 mg/kg TBT を経口投与した。24 時間後に脳を摘出し、部位分けして大脳皮質、海馬、小脳の各部位を以下の実験に用いた。スズ、マンガ、銅、亜鉛の微量元素 4 種類を ICP-MS により測定し、定量を行った。また、GluR2 関連タンパク質の発現を主としてウエスタンブロットにより、また、その mRNA 発現をリアルタイム PCR によりそれぞれ定量した。

3-3. GluR2 発現簡便評価系の開発

GluR2 を指標物質とした *in vitro* スクリーニング試験を構築する目的で、ELISA をより簡便化した手法である AlphaLISA[®] を利用した新規 GluR2 発現簡便評価系の構築を行った。ラット胎仔大脳皮質初代神経細胞に TNE buffer を添加し、細胞可溶化液を調製しアッセイに用いた。各種条件検討後、既存の GluR2 発現測定法であるウエスタンブロットとの比較検討を行った。

3-4. GluR2 発現減少物質の探索

構築された GluR2 簡便評価系を用いて、環境化学物質の中から GluR2 発現減少物質の探索を行った。

4. 研究成果

4-1. GluR2 発現減少メカニズムの解明

20 nM TBT 曝露による GluR2 プロモーターへの、核呼吸因子-1 (NRF-1) の結合についてクロマチン免疫沈降により検討を行ったところ、TBT を曝露した細胞では曝露 3 時間後から GluR2 プロモーターの NRF-1 結合領域への NRF-1 の結合量が減少していることが明らかとなった。このことから、GluR2 プロモーターへの NRF-1 の結合が減少することにより GluR2 発現が減少していることが示唆された。

4-2. In vivo 影響評価

TBT を投与したラットの各脳部位においてスズが同程度認められたことから、TBT が脳の各部位に同程度移行していることが明らかとなった。マンガン、銅、亜鉛量についてはいずれの脳部位においても TBT 投与群とコントロール群で差は認められなかった。GluR2 および関連タンパク質とその mRNA 発現について検討したところ、TBT 投与群において GluR2 の減少傾向が認められ、また、GluR2 発現を正に制御しているという報告のある脳由来神経栄養因子 (BDNF) のタンパク質および mRNA 発現が有意に減少していた。

4-3. GluR2 発現簡便評価系の開発

アッセイに適用可能な 6 種の市販抗 GluR2 抗体を検討した結果、ビオチン化した Anti-GluR2 monoclonal Antibody (MILLIPORE Corp., MAB397) と脱塩処理した GluR2 (Y873) polyclonal antibody (Bioworld Technology Inc., BS3658) をアッセイに用いることとした。アッセイに必要な複合体形成を確認することができた。抗体の選択や可溶化条件など最適条件を検討した後、WB と同サンプルで GluR2 発現を測定し、比較検討

したところ正の相関($R^2 = 0.73$)が得られた。本測定系を用いることにより、短時間で 96 サンプルの化学物質評価が可能となり、GluR2 発現減少を介した神経毒性を有する環境化学物質をより簡便かつ大規模に探索できる。

4-4. GluR2 発現減少物質の探索

GluR2 発現減少物質を探索したところ、無機鉛、有機リン系農薬フェンチオン、ネオニコチノイド系農薬アセタミプリドなど一部の環境化学物質において GluR2 発現減少が認められた。

以上の結果より、有機スズが GluR2 発現を減少させるメカニズムの一部が解明された。有機スズによる GluR2 発現減少が惹起する in vivo 影響評価については解明途中であるものの、GluR2 簡便測定系が構築され、有機スズ以外の GluR2 減少物質も複数見出されたことから、本研究が、有機スズをはじめとする GluR2 発現減少物質による神経毒性の糸口となることが期待される。

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)

1. Isomura M, Kotake Y, Masuda K, Miyara M, Okuda K, Samizo S, Sanoh S, Hosoi T, Ozawa K, Ohta S. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca^{2+} -mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Oct 1;272(1):137-46. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.026. (査読有)

2. Ishida K, Kotake Y, Miyara M, Aoki K, Sanoh S, Kanda Y, Ohta S. Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):513-21.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/3/38_513/_article (査読有)

3. Yamada S, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y. AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics*. 2013 May;5(5):484-91. doi: 10.1039/c3mt20268b. (査読有)

4. Kotake Y. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(11):1876-80.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/11/35_b212017/_article (査読有)

5. Klionsky DJ, . . . , Kotake Y, . . . et al. (1270 名中 548 番目), Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544. <https://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/19496/?nocache=1671244998> (査読有)

6. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012 Dec;40(12):2267-72. doi:10.1124/dmd.112.047555. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 宮良政嗣、古武弥一郎、太田 茂 低濃度 MPP+によるオートファジー阻害を介した神経毒性メカニズムの解明 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 27-30 日 熊本

2. 古武弥一郎 有機スズによるグルタミン酸受容体発現減少を介した神経影響 メタルバイオサイエンス 2013 2013 年 9 月 26-27 日 静岡

3. Miyara M, Kotake Y, Ohta S. Low concentration of Parkinson's disease-related neurotoxin MPP+ inhibits autophagy. The 13th International Congress of Toxicology 2013 年 6 月 30 日 -7 月 4 日 ソウル (韓国)

4. 宮良政嗣、古武弥一郎、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒 MPP+低濃度曝露によるオートファジー阻害 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013 年 6 月 17-19 日 千葉

5. 古武弥一郎、幸田龍紀、宮良政嗣、太田 茂 パーキンソン病関連化学物質による神経毒性メカニズム フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー 2012 年 10 月 25-26 日 名古屋

6. 古武弥一郎 パーキンソン病関連神経毒性物質によるチュープリンのユビキチン化阻害とオートファジー 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012 年 7 月 17-19 日 仙台

6 . 研究組織

(1) 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院・准教授

研究者番号 : 20335649

(2) 研究分担者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 60160503

小椋 康光 (OGRA YASUMITSU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40292677