

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21405

研究課題名(和文)メチル水銀による小脳顆粒細胞特異的傷害“炎症仮説”の分子機構

研究課題名(英文)Molecule targets and intracellular signal transduction in "Inflammation hypothesis" as pathology of cerebellum damage by methylmercury

研究代表者

吉田 映子(YOSHIDA, Eiko)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：50735488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小脳皮質の顆粒細胞層が特異的に傷害されることは、水俣病の病理において未解決な主要問題の一つである。小脳においてもメチル水銀中毒初期に大脳と同じく浮腫形成が認められるが、顆粒細胞層特異的な病変形成を「浮腫形成に伴う循環組織障害」だけでは十分に説明することは難しい。メチル水銀中毒ラットの小脳の病理組織学的な解析は、顆粒細胞層に細胞傷害性T-リンパ球およびマクロファージが浸潤し、顆粒細胞がアポトーシスを起こしていること示した。すなわち、メチル水銀による小脳顆粒細胞層の傷害に炎症性細胞が関与することが示唆される。このメカニズムを“炎症仮説”と名付け、培養細胞を用いてこの仮説の分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury is an environmental pollutant that induces serious neurological damage in the brain of humans and animals. Methylmercury-induced damage is localized in the granule cell layers in the cerebellum, although the mechanisms have been unclear. In the present study, it was revealed that methyl mercury elevates the expression of TNF- $\alpha$  by activating ERK, p38 MAPK, and NF- $\kappa$ B in macrophage-like RAW264.7 cells. Additionally, the damage of rat cerebellum granule cells caused by TNF- $\alpha$  was comparable with vascular endothelial cells, a cell type highly sensitive to the cytokine. Methylmercury increased the synthesis of both perforin and granzyme B through activation of the PTP1B-EGFR-MAPK pathway in Jurkat E6.1 cells. The present results support the hypothesis that inflammatory cells such as macrophages and cytotoxic T-lymphocytes are involved in the selective damage of the granule cell layers in the cerebellum of methylmercury-exposed humans and animals via the TNF- $\alpha$  cytotoxicity.

研究分野：環境・衛生系薬学，衛生学・公衆衛生学

キーワード：水俣病 メチル水銀 小脳障害 炎症仮説 マクロファージ T-リンパ球

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水俣病の原因物質となったメチル水銀は、ハンター・ラッセル症候群と呼ばれる中枢神経障害を主徴とした毒性を発現することが知られている、一方、水俣病患者の病理において未解決となっている主要な問題として以下の2つが挙げられる。

第一に、大脳組織における病変部位の限局性である。水俣病患者の大脳の組織傷害は、大脳皮質の深い脳溝周辺組織に限局しており、傷害部位に依存して感覚障害、聴力障害、視野狭窄など特徴的な神経症状が観察される。このメチル水銀による部位特異的な大脳傷害の発生のメカニズムとして、衛藤らにより“浮腫仮説”が提唱されている。これは、メチル水銀曝露の初期段階において脳浮腫が形成されることで、深い脳溝周辺組織が特に強く圧迫され、その結果生じる組織循環障害により神経の脆弱化が引き起こされるというものである。

第二は、小脳において小脳性運動失調の原因とされる顆粒細胞層への特異的な傷害が発生していることである。小脳においてもメチル水銀中毒の初期段階において大脳と同様に浮腫形成が認められるが、小脳顆粒細胞層への部位特異的な傷害を“浮腫仮説”だけでは十分に説明することは難しい。しかしながら、それに変わる病理仮説も存在していない。メチル水銀による小脳傷害について、これまでの観点は、小脳組織を構成する顆粒細胞、プルキンエ細胞およびグリア細胞のメチル水銀への感受性の差から顆粒細胞特異的な毒性の発現を説明するものが多く、その感受性についてのみ議論の焦点が当てられていた。しかしながら、そのような感受性の差はメチル水銀の神経細胞に対する直接的な作用の理解には重要であるが、小脳顆粒細胞の急速で大規模な傷害の発現メカニズムを合理的に理解するには難しい。

当研究室では、メチル水銀投与により後肢交叉という典型的な中毒症状が誘発されたラットの小脳を用いて、病理組織学的な検討を行った。メチル水銀中毒ラットの小脳において脱髄鞘やグリオシスは認められなかったが、メチル水銀投与後21日目以降の顆粒細胞層において萎縮性の退行性変化が顕著に観察された。しかしながら、プ

ルキンエ細胞層や分子層では、このような萎縮性の退行性は認められなかった。さらに、この小脳顆粒細胞の退行性変化がアポトーシスに起因することが示された。また、このとき細胞傷害性Tリンパ球およびマクロファージが小脳顆粒細胞層に浸潤しており、IL-2やTGF- $\beta$ などの炎症性サイトカインの発現が上昇していることが明らかになった。これらの結果は、メチル水銀曝露の初期段階で生じた顆粒細胞傷害が引き金となり、細胞傷害性Tリンパ球やマクロファージが小脳顆粒細胞層に浸潤した結果、放出された炎症性サイトカインにより顆粒細胞に急速かつ大規模なアポトーシスを誘発する可能性を示唆している。このような炎症性変化を我々は“炎症仮説”として提唱している。

しかしながら、メチル水銀の小脳障害の炎症性変化に関わるメカニズムを説明し得る分子的基盤は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに所属研究室で得られた知見を発展させ、“炎症仮説”の分子機構を全面的に明らかにすることである。“炎症仮説”に含まれる事象には、脳微小血管を反応の場とするものと顆粒細胞層を反応の場とするものがある。2015年度から2017年度に、このうち特に重要な以下の3つに対するメチル水銀の作用機序の解明を試みた。

(1) 細胞傷害性T-リンパ球・マクロファージの顆粒細胞層浸潤に関わる脳微小血管の細胞外マトリックスの特性変化の重要な要因としての脳微小血管内皮/周皮細胞のプロテオグリカンの発現、(2) 細胞傷害性T-リンパ球による顆粒細胞アポトーシス誘導機構としての細胞傷害性T-リンパ球からのグランザイムB/パーフォリンの放出および(3) マクロファージによる顆粒細胞の傷害メカニズムとしてのマクロファージからの炎症性サイトカインの放出を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞を培養し、メチル水銀で処理する。細胞層および培地に蓄積したプロテオグリカンを非会合条件下で抽出し、ウエスタンブロ

ット分析によってこれらの cell type が発現しているプロテオグリカン分子種（パルカン、ビグリカン、シンデカン-1、デコリンなど）の発現変動を調べ、Real time RT-PCR法によりそれぞれの分子種の遺伝子発現の変化を調査した。

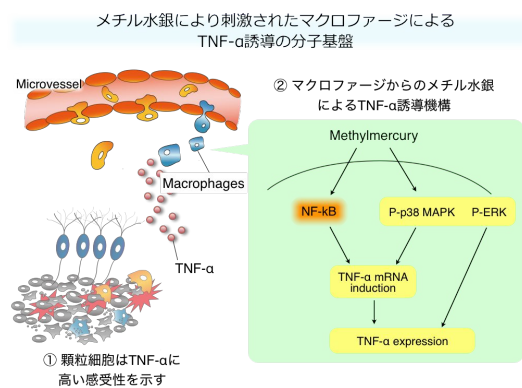
(2) および(3) Tリンパ球のモデルとしてヒトTリンパ球白血病株 Jurkat E6.1 細胞を、マクロファージのモデル細胞として RAW264.7 細胞を用いた。メチル水銀による TNF- $\alpha$ 、Perforin および GranzymeB の培地中への蓄積量は ELISA 法にて検討した。また、遺伝子の発現は Real-time RT-PCR 法を用いて解析した。さらに、シグナル経路の活性化に関する調査は Western blot 法、細胞内 PTP1B の酵素活性測定は PTP1B の EIA kit を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞傷害性 T-リンパ球・マクロファージの顆粒細胞層浸潤に関わる脳微小血管の細胞外マトリックスの特性変化の重要な要因としての脳微小血管内皮細胞および周皮細胞のプロテオグリカンの発現を検討したところ、周皮細胞でのみ顕著なヘパラン硫酸プロテオグリカン分子種シンデカン-4 の誘導が認められた。この誘導の一部に p38 MAPK の活性化が関与する可能性が示唆された。

(2) マクロファージに対するメチル水銀の作用について：RAW264.7細胞においてメチル水銀の曝露濃度および時間依存的な Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) mRNA の上昇が認められ、それに伴い TNF- $\alpha$  の分泌量が有意に増加した。ラット初代小脳顆粒細胞の TNF- $\alpha$  感受性を、内皮細胞（TNF- $\alpha$  高感受性）および血管平滑筋細胞（TNF- $\alpha$  低感受性）と比較したところ、内皮細胞では 5 ng/mL の TNF- $\alpha$  より細胞傷害が認められ、血管平滑筋細胞では細胞傷害が観察されなかった。それに対し、小脳顆粒細胞では、1 ng/mL より TNF- $\alpha$  による顕著な細胞傷害が認められた。これにより小脳顆粒細胞が TNF- $\alpha$  に対してきわめて高い感受性を示すことが明らかとなった。一方、RAW264.7細胞においてメチル水銀は ERK、p38 MAPK および JNK をすべて活性化させた。各阻害剤を用いた検討によりメチル水銀による TNF- $\alpha$  の発現誘導には p38 MAPK、一部

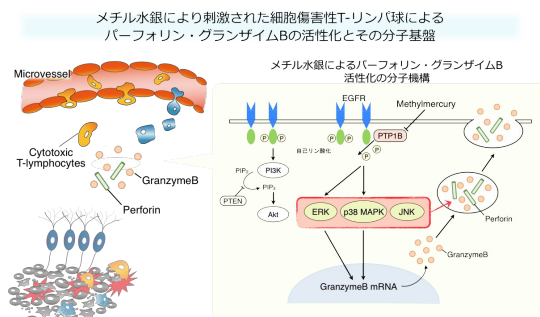
TNF- $\alpha$  の分泌に ERK の活性化が関与することが示唆された。また、RAW264.7細胞においてメチル水銀は I $\kappa$ B のリン酸化を促進し、転写因子 NF- $\kappa$ B (p65) を核内移行させることが分かった。さらに、NF- $\kappa$ B (p65) の発現抑制によりメチル水銀による TNF- $\alpha$  の誘導は抑制された。これらの結果から、メチル水銀は顆粒細胞層に浸潤したマクロファージに対し、p38 MAPK 経路の活性化を通じて TNF- $\alpha$  の発現を上昇させること、および小脳顆粒細胞が TNF- $\alpha$  に対してきわめて高い感受性を示すことが明らかとなった。



(3) 細胞傷害性 T-リンパ球細胞に対するメチル水銀の作用について：細胞傷害性 T-リンパ球による顆粒細胞の傷害にはパーフォリン (PFN)・グランザイム B (GZMB) 経路が重要であるとの仮説に基づき検討を行った。Jurkat細胞においてメチル水銀は培地への PFN および GZMB の蓄積量を顕著に増加させた。このとき PFN mRNA の発現誘導は微弱であったが、GZMB mRNA は顕著に上昇した。PFN および GZMB の発現誘導に関わるシグナルとして PI3K-Akt 経路が報告されているが、Jurkat細胞においてメチル水銀は Akt を活性化するものの、PI3K 阻害剤でメチル水銀による PFN/GZMB の発現上昇は抑制されなかった。そこで、求電子性化合物のセンサータンパク質として知られる PTP1B、およびそれにより活性化が制御される EGFR と下流シグナルである MAPK 経路を検討したところ、メチル水銀により EGFR および全ての MAPK 経路 (ERK、p38 MAPK および JNK) が活性化した。このとき細胞内 PTP1B の活性はメチル水銀によって阻害されていた。さらに、各阻害剤を用いた検討により、メチル水銀による GZMB の発現誘導は、EGFR-ERK および p38 MAPK 経路を介

して遺伝子レベルで誘導すること、一方、PFNタンパク質の発現上昇はEGFRおよび全てのMAPK阻害剤により抑制され、EGFR-MAPK経路を介してPFNタンパク質の放出を促進することが示された。

本研究成果より、顆粒細胞層に浸潤した細胞傷害性T-リンパ球およびマクロファージがメチル水銀によって刺激され、特定の細胞内シグナルが活性化される結果、それぞれPFN/GZMB経路の活性化およびTNF- $\alpha$ の分泌亢進によって顆粒細胞を傷害することが示唆された。



## 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) Hirooka T, Yoshida E, Eto K, Kaji T. Methylmercury induces hyaluronan synthesis in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes via different mechanisms. *The Journal of Toxicological Sciences*. 42(3); 329-333, 2017. DOI:10.2131/jts.42.329. 査読あり.
- 2) Yoshida E, Kurita M, Eto K, Kumagai Y, Kaji T. Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells via induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Toxicology*. 1; 392: 40-46, 2017. DOI:10.1016/j.tox.2017.09.013. 査読あり.

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 吉田 映子, 佐々木 優, 金 純子, 鍛冶 利幸. メチル水銀による小脳障害の病理仮説「炎症仮説」における標的分子とし

グナル経路. フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー(招待講演). 2017年9月, 仙台.

- 2) 佐々木 優, 吉田 映子, 鍛冶 利幸. メチル水銀による感覚神経優位な傷害とTNF- $\alpha$ による炎症性変化の関与. 第4回東京環境健康薬学研究会 2017年8月, 東京.
- 3) Eiko Yoshida, Kenta Sakurai, Chika Yamamoto, Toshiyuki Kaji. Mechanisms underlying VEGF induction by methylmercury in cultured human brain microvascular pericytes. Society of Toxicology's 56th Annual Meeting. 2017年3月10日~14日, Baltimore.
- 4) 金 純子, 吉田 映子, 鍛冶 利幸. 水俣病における小脳障害の病理仮説-炎症仮説-の分子メカニズム-Jurkat細胞においてメチル水銀により活性化されるパーフォリン/グランザイムB経路-. 環境省メチル水銀研究ミーティング. 2016年12月, 東京.
- 5) 吉田 映子, 鍛冶 利幸. 水俣病の病理仮説-炎症仮説-を構成する分子的基盤:メチル水銀によるJurkat細胞のパーフォリン/グランザイムB経路の活性化. 衛生薬学・環境トキシコロジー若手研究者の会 フォーラム 2016 プレシンポジウム. 2016年9月, 東京.
- 6) 金 純子, 吉田 映子, 鍛冶 利幸. メチル水銀によるJurkat細胞のパーフォリン/グランザイムB経路の活性化とそのメカニズム. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2016年9月, 東京.
- 7) 佐々木 優, 吉田 映子, 鍛冶 利幸. マクロファージ細胞においてメチル水銀により発現上昇し小脳顆粒細胞死を誘発するTNF- $\alpha$ . 第3回東京環境健康薬学研究会. 2016年8月, 千葉.
- 8) 金 純子, 吉田 映子, 鍛冶 利幸. Jurkat細胞においてメチル水銀により活性化されるパーフォリン/グランザイムB経路とその分子機構. 第3回東京環境健康薬学研究会. 2016年8月, 千葉.
- 9) 佐々木 優, 吉田 映子, 藤江 智也, 藤原 泰之, 山本 千夏, 鍛冶 利幸. メチル水銀はRAW264.7細胞においてTNF- $\alpha$

- の発現を誘導する.第43回日本毒性学会  
学術年会. 2016年6月,愛知.
- 10) 金 純子,吉田 映子,藤江 智也,山本 千  
夏,藤原 泰之,鍛冶 利幸.メチル水銀  
による Jurkat 細胞のパーフォリン/グ  
ランザイム B 経路の活性化およびそれ  
を担う分子基盤.第43回日本毒性学会学  
術年会. 2016年6月,愛知.
  - 11) 金 純子,吉田 映子,藤江 智也,山本 千  
夏,藤原 泰之,鍛冶 利幸.メチル水  
銀に曝露した Jurkat 細胞におけるパー  
フォリン/グランザイム B 経路の活性  
化.日本薬学会第136年会.2016年3月,  
横浜.
  - 12) 吉田映子,鍛冶利幸.メチル水銀の小脳  
傷害のメカニズムに関する提案.環境省  
メチル水銀研究ミーティング.2016年1  
月,東京.
  - 13) 佐々木 優,吉田 映子,藤江 智也,鍛  
冶 利幸.メチル水銀はマクロファージ  
において小脳顆粒細胞死を誘発する  
TNF- $\alpha$  の発現を上昇させる.フォーラム  
2015 衛生薬学・環境トキシコロジー.  
2015年9月,神戸.
  - 14) 櫻井健太,吉田 映子,山本 千夏,鍛冶  
利幸.メチル水銀に曝露した培養ヒトの  
う微小血管周皮細胞における VEGF 発  
現誘導機構.第42回日本毒性学会学術  
年会.2015年7月,金沢.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.rs.tus.ac.jp/kaji-lab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 映子 (YOSHIDA, Eiko)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号: 50735488