

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0024

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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The mechanism of oxidative neuronal injury induced by methylmercury.(Fostering Joint International Research)

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） 10,100,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では芳香族炭化水素受容体（AhR）を介した酸化的神経障害のメカニズム解明を目指した。AhRにより発現制御を受ける遺伝子の解析から、NADPH oxidaseのサブユニットの1つであるp47phoxを同定した。p47phoxはそのプロモーター領域に2つのダイオキシン応答配列（DRE）をもち、AhRにより直接、発現制御を受けた。p47phoxはAhR刺激により活性酸素を生成した。また、AhRの標的として炎症性サイトカインIL-33も同定した。IL-33のプロモーター領域に2つのDREが存在し、これらの1つがAhRに応答した。本研究では、AhRの下流で障害的に働く2分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、メチル水銀をはじめとした化学物質によるAhRを介した酸化的神経障害メカニズムを示すものである。AhRは、ダイオキシン類の受容体であり、リガンドが結合すると代謝酵素の発現を上昇させる解毒に関わる転写因子としての一面が良く研究されているが、本研究から、AhRが酸化ストレスのレギュレーターとなり、また炎症反応を制御するという従来とは異なる役割が示される。化学物質による神経毒性メカニズムが明らかになることにより、化学物質に感受性の高いグループが同定できるため、化学物質の使用に際してオーダーメイドの対策が可能となり、化学物質による障害の予防にも役立つ。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to elucidate the mechanism by which aryl-hydrocarbon receptor (AhR) regulates neuronal oxidative stress. From the global analysis, it was revealed that p47phox, a subunit of NADPH oxidase, was upregulated by AhR. p47phox has two dioxin-response elements (DREs) in its promoter region and AhR could bind to both DREs. Oxidative stress induced by AhR was due to increases in p47phox expression. IL-33, a proinflammatory cytokine, was also upregulated by AhR. Two DREs are in the IL-33 promoter region and one of these was responsible for AhR. Together, AhR can be involved in oxidative neuronal injury via activation of NADPH oxidase and upregulation of inflammatory cytokines.

研究分野：毒性学

キーワード：芳香族炭化水素受容体 ミクログリア マクロファージ 酸化ストレス 炎症

1. 研究開始当初の背景

環境化学物質であるメチル水銀は水俣病の原因物質であり、神経系に特異的な毒性を示すことが知られている。メチル水銀は神経細胞に酸化的障害を引き起こすが、そのメカニズムには不明な点が多い。申請者は、基課題において、メチル水銀による活性酸素産生機序を調べ、下記4つの知見を得た。

メチル水銀はミクログリアで芳香族炭化水素受容体 (AhR) の発現を上昇させる。
AhR はミクログリアの活性酸素産生を亢進する。
活性酸素は NF-kB 活性を亢進し、炎症反応を促進する。
炎症反応もニューロンを障害する。

これらの結果は、AhR がメチル水銀による活性酸素生成を最も上流で制御していることを示唆している。さらに興味深い点は、AhR はダイオキシン類をはじめとする環境化学物質により活性化することから、ミクログリア AhR を介した活性酸素産生は、メチル水銀だけでなく、広く環境化学物質による神経影響に関わる可能性が提起されたことである。つまり、ミクログリアに発現する AhR の生理的役割をより詳細に調べることによって、環境化学物質による神経障害機序の一端が明らかになるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、AhR によるミクログリア酸化ストレス制御の分子メカニズムを明らかにし、また、この現象やメカニズムがメチル水銀以外の環境化学物質に当てはまるかを調べることにより、化学物質による酸化的神経障害の本態がミクログリア AhR 発現にある可能性を検討する(図1)。最近の研究により、脳内にはミクログリアだけでなくマクロファージも常在することが分かっていたため、ミクログリアとマクロファージ双方の AhR に焦点をあてて研究を進める。

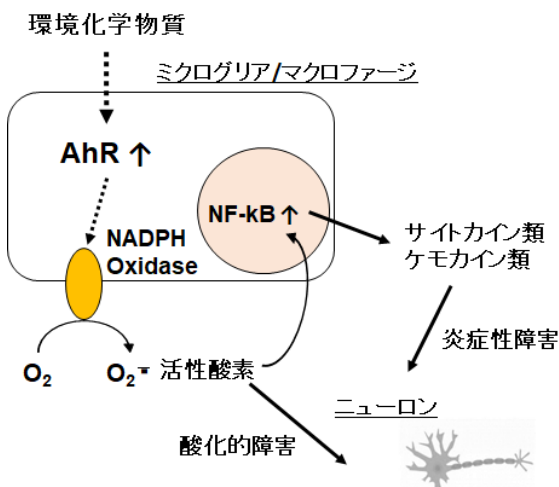


図1. 本研究の作業仮説

メチル水銀などの環境中の化学物質の一部は脳内の免疫担当細胞であるミクログリアやマクロファージにおいて AhR の発現や活性を増大させる。その結果、NADPH oxidase が活性化し、大量の活性酸素が生成してニューロンを障害する。或いは、AhR は炎症性サイトカインやケモカインの発現を誘導し、神経炎症を惹起する。この過剰な炎症反応により、ニューロンが障害を受ける。

3. 研究の方法

マウス AhR には応答性が高い b アレルと低い d アレルがあり、種間で AhR 応答性が異なる。一方、ヒトではそのような遺伝子型の違いは認められていないため、ヒト細胞を用いて解析することとした。ヒト単球細胞である THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によりマクロファージ様に分化誘導し (THP-1 Mac) 研究に用いた。

C57BL/6 マウスより骨髄由来マクロファージとミクログリアを調製した。成獣の大腿骨より骨髄細胞を分離し、50 ng/mL GM-CSF の存在下で7日間培養することによりマクロファージへと分化させた。生後0-1日齢のマウスから大脳皮質を単離し、トリプシンと DNaseI で処理して分散させた後、10-12日間培養した。単層のアストロサイト上に増殖するミクログリアを、培養フラスコを振盪することによって分離し、単一の培養ミクログリアを得た。

4. 研究成果

1) AhR 刺激による NADPH oxidase サブユニット, p47phox の発現増大と酸化ストレスの亢進
マクロファージやミクログリアなどの貪食細胞の主な活性酸素生成源は NADPH oxidase である。NADPH oxidase は複数のサブユニットから成る細胞膜局在性の酵素であり、NADPH を基質としてスーパーオキシドを細胞外へ放出する(図2A)。そこで、まず NADPH oxidase に着目し、THP-1 Mac を AhR リガンドで刺激した時のサブユニットの発現を調べた。

静止型またはリポポリサッカリド (LPS, Toll-like receptor 4 のアゴニスト) で活性化した THP-1 Mac を 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) または Kynurenine (KYN) で刺激した。TCDD または KYN は、静止型 THP-1 Mac に対して p47phox mRNA の発現を誘導した(図2B)。LPS

処置により、NOX-2、p47phox および p67phox の mRNA 発現が増大し、TCDD と KYN は活性化 THP-1 Mac の p47phox mRNA 発現を大きく増大させた (図 2B)。ウエスタンブロッティングによりタンパク質の発現も調べたところ、p47phox タンパク質は TCDD と KYN 処置により増加した (図 2C)。従って、p47phox は静止型、活性化マクロファージにおいて、AhR の標的となることが示された。

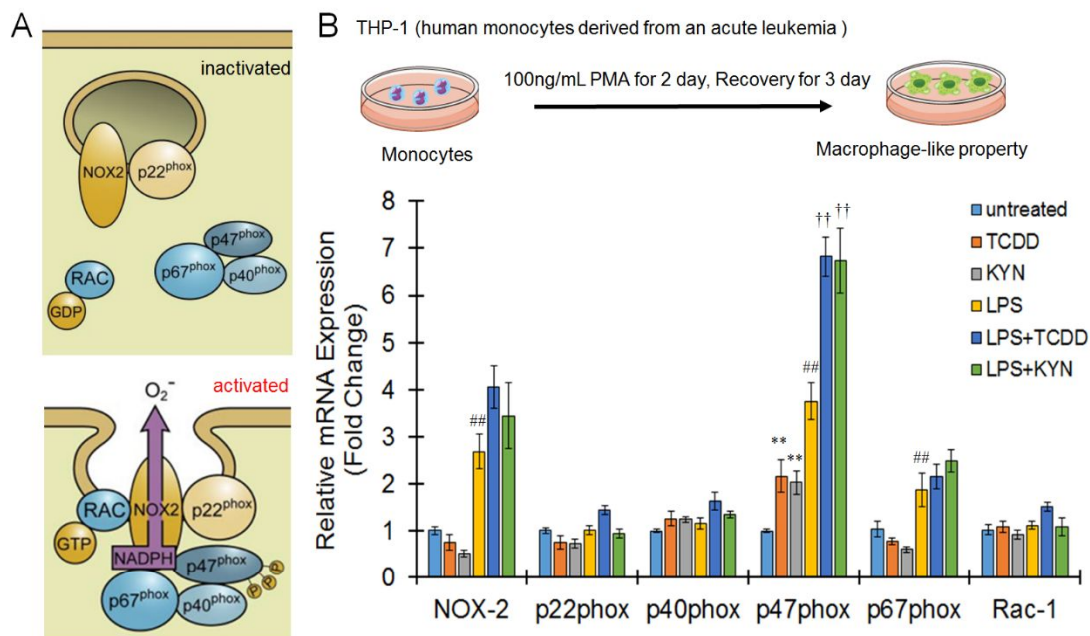


図 2. AhR 刺激による p47 の発現亢進

(A) NADPH oxidase 複合体の模式図 (Physiol Rev 87:245, 2007 より抜粋)。Superoxide は NOX2 サブユニットにより生成される。p47phox は、リン酸化により NOX-2 と結合し、superoxide 産生を亢進する。(B) ヒト単球細胞株 THP-1 を PMA によりマクロファージ様に分化させ、本実験に使用した。THP-1 を AhR アゴニストである TCDD (10 nM)、KYN (50 μM)、10 ng/mL LPS、LPS+TCDD、または LPS+KYN で 6 時間処置した後、NADPH oxidase 各サブユニットの mRNA 発現を調べた。N = 4, Bar = SE. (C) THP-1 を (B) と同様に 24 時間処置した後、ウエスタンブロッティングにより p47phox、NOX-2 の発現を解析した。

次に、細胞の酸化ストレスを評価した。NADPH oxidase 阻害薬である apocynin の存在下でチトクロム c 法より、THP-1 Mac より産生するスーパーオキシドアニオンを定量した。Apocynin-inhabitable なスーパーオキシド生成は TCDD と KYN 処置により有意に増加し、また、LPS で処置した THP-1 Mac においても TCDD、KYN によりスーパーオキシドアニオン量が増大した (図 3)。従って、AhR の下流で発現が増加する p47phox は、酸化ストレスを惹起すると考えられる。

ヒト p47phox の転写開始点上流の AhR 結合部位を TRANSFAC database により探索したところ、2 箇所の dioxin response elements が同定され、これらを DRE1 と DRE2 と名づけた (図 4A)。ChIP アッセイにより DRE1 と DRE2 への AhR のリクルートを調べたところ、TCDD おおび KYN 処置により、DRE1、DRE2 の双方に AhR がリクルートされることが確認できた (図 4B)。従って、THP-1 Mac における AhR 依存的な p47phox 発現亢進には、そのプロモーター領域における DRE1 と DRE2 が関与すると考えられる。また、TRANSFAC database により NF-κB 結合領域を検索すると、1 箇所の NF-κB response element が同定された。従って、LPS で活性化した THP-1 Mac における p47phox の誘導には、これら DREs と NF-κB RE が協調して作用するのかもしれない。

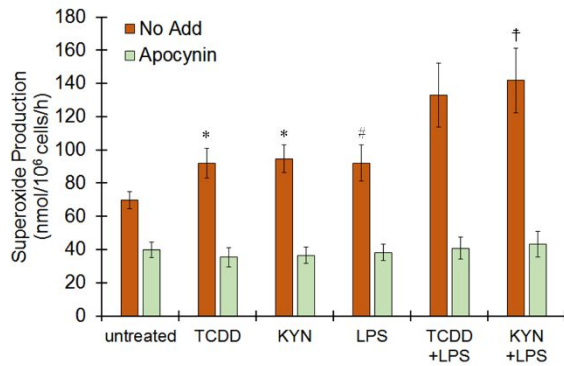


図3. AhR 刺激による活性酸素生成亢進
THP-1 を TCDD (10 nM), KYN (50 μM) 10 ng/mL LPS、LPS+TCDD、または LPS+KYN で 24 時間処置した後、チトクロム c 法により、生成する superoxide を測定した。また、NADPH oxidase 阻害薬である apocynin (100 μM) を加えて同様の測定を行った。N = 4, Bar = SE.

A Human p47phox Promoter

NF-kB RE DRE1
 caatttgggtg aaaccoccatc actataaaaa tacaaaaaat tagccggaca tgggtggtgca cgccgtgtaat
DRE2 -2501
 tgataccocct totctactaa aaatacaaaa ttagCcaagc gtaggtggcgc acacccgtaa tcccagctac
-1944

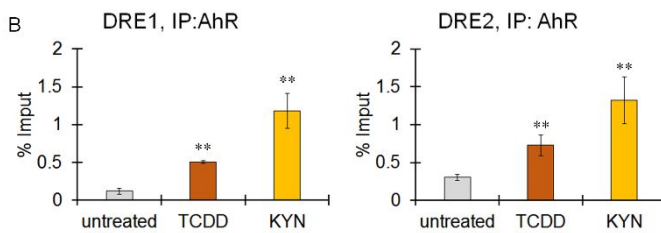


図4. P47phox プロモーターにおける機能的 DRE の同定

(A) Human p47phox promoter の構造。転写開始点より 1944 bp、および、2501 bp 上流に 2 つの DRE が認められる。また、ほぼ同程度の位置に NF-kB 結合領域も存在する。(B) THP-1 を AhR アゴニストである 10nM TCDD, 50 μM KYN で 1 時間処置した後細胞を回収し、抗 AhR 抗体を用いて ChIP を行った。p47phox promoter に存在する DRE1、DRE2 を特異的に増幅するプライマーを用いて real-time PCR を行い、プロモーター上にリクルートされる AhR を評価した。N = 3, Bar = SE.

最後に、THP-1 Mac で生じた AhR による p47phox 発現の亢進が生体内の現象へと拡張できるか否かについて初代培養細胞を用いて検討した。ヒトミクログリアを用いることは難しいため、C57BL/6 マウス (AhR b アレル) よりミクログリアを単離・培養した。また、骨髄由来マクロファージも調製し、それぞれを AhR リガンドである TCDD, 5,11- Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ, 100nM) または KYN で刺激した。これらすべての AhR リガンドの刺激により、p47phox mRNA が増加した (図5)。従って、AhR 下流における p47phox の発現上昇と酸化ストレスの惹起は、広くマクロファージ、ミクログリアに共通の現象であると考えられる。

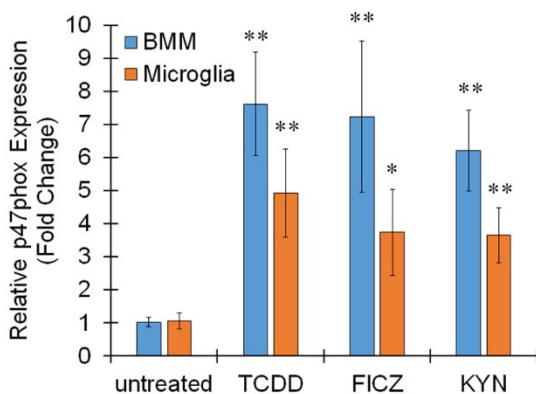


図5. 骨髄由来マクロファージ、ミクログリアにおける AhR 依存的 p47phox 発現上昇

マウスより骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophage, BMM) とミクログリアを単離・培養した。それぞれを AhR アゴニストである 10nM TCDD、5,11- Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6-carboxaldehyde (FICZ, 100nM) または、50 μM KYN で 6 時間処置した後、real-time PCR により p47phox の発現を調べた。N = 3, Bar = SE.

以上の結果より、マクロファージ/ミクログリアにおいて、AhR の下流で p47phox の発現が亢進し、酸化ストレスが増大することが明らかとなった。従って、AhR 刺激活性を有する化学物質はこの経路を介して酸化ストレスを惹起することが可能であり、さらに興味深いことに、AhR による p47phox 発現は炎症による p47phox 発現と相加的に作用する。脳内免疫細胞の AhR 刺激による活性化は、ニューロンの酸化的傷害の一因となることが示唆された。

2) AhR 刺激による IL-33 発現の亢進

THP-1 Mac を用い、AhR の下流で発現する炎症性分子を探索したところ、AhR リガンドにより Interleukin-33 (IL-33) の発現が上昇することを見出した。IL-33 は核に局在するアラミンであり、細胞障害により受動的に細胞外に放出されると炎症反応やアレルギー反応を惹起するとされる。また、最近、IL-33 はミクログリアに作用してシナプスの貪食による神経回路網の成熟に関与することが報告された (Science 359:1269, 2018)。従って、異常な (過剰な) IL-33 は

ミクログリアの機能を修飾して異常な回路網形成を引き起こす可能性がある。

マクロファージにおける AhR-依存的 IL-33 発現誘導については 2019 年 4 月 22 日付けで Toxicological Sciences 誌に受理された。紙面の都合上、詳細は Toxicological Sciences 誌を参照して頂きたい。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件、すべて査読有)

1. Ishihara Y, Haarmann-Stemmann T, Kado NY, Vogel CFA. Interleukin 33 expression induced by aryl hydrocarbon receptor in macrophages. Toxicol Sci. In Press (2019).
2. Tsuji M, Koriyama C, Ishihara Y, Vogel CFA, Kawamoto T. Association between bisphenol A diglycidyl ether-specific IgG in serum and food sensitization in young children. Eur J Med Res. 23(1):61 (2018).
3. Ishihara Y, Tsuji M, Vogel CFA. Suppressive effects of aryl-hydrocarbon receptor repressor on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Arch. Biochem. Biophys. 642:75-80 (2018).

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 石原 康宏、山崎 岳、Christoph Vogel. 芳香族炭化水素受容体による p47phox 発現亢進と酸化ストレスの誘導. 第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 24 日~26 日(京都国際会議場).
2. 石原 康宏、Christoph F. A. Vogel. Aryl-hydrocarbon Receptor Repressor による脂肪細胞分化抑制作用. 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018 年 7 月 18 日~20 日(大阪国際会議場).
3. 石原 康宏、Christoph F. A. Vogel. マクロファージにおける芳香族炭化水素受容体を介したインターロイキン 33 の発現上昇. 第 133 回日本薬理学会近畿部会 2018 年 6 月 1 日(広島県医師会館).
4. 石原 康宏、田中 美樹、伊藤 康一、山崎 岳、Christoph FA Vogel. 脳虚血時に生じる芳香族炭化水素受容体を介した酸化的神経障害. 第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 NO 学会合同学術集会 2018 年 5 月 17 日~18 日(京都ホテルオークラ).
5. 石原 康宏、Christoph F. A. Vogel. 芳香族炭化水素受容体によるインターロイキン 33 の発現誘導. 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 25 日~28 日(石川県立音楽堂等).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

URL: <http://www.biomed.hiroshima-u.ac.jp/~ishihara/>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名: Christoph Vogel

ローマ字氏名: Christoph Vogel

所属研究機関名: University of California, Davis

部局名: Center for Health and the Environment

職名: Research Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名: Thomas Haarmann-Stemmann

ローマ字氏名: Thomas Haarmann-Stemmann

所属研究機関名: Leibniz Research Institute for Environmental Medicine

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。