

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00569

研究課題名(和文) マウス脳内性ホルモンによる神経保護作用と脳の脆弱性の性差

研究課題名(英文) Sexual differences in neuroprotective effect and brain fragility by mouse brain sex hormones

研究代表者

山崎 岳 (Yamazaki, Takeshi)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：30192397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに亜急性毒性レベルのメチル水銀を投与すると、典型的な水銀毒性が現れる半分ほどの投与量で、中脳水道周囲灰白質に特異的に酸化ストレスが生じ、アストロサイトが活性化され、アクアポリン4の発現が増加して、浮腫が生じた。この部位の水銀蓄積量は、メチル水銀の毒性の影響が見られない大脳皮質や小脳と同程度であり、中脳水道周囲灰白質が特にメチル水銀に脆弱であることが明らかになった。現在、この部位への毒性や他の毒性の性差と性ステロイドホルモンの関連性を調べている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水銀はいまだにかなりの量が環境に放出されており、メチル水銀によるヒトの低濃度汚染のリスクは続いている。一方、水俣病の原因が明らかになって60年以上経過した現在でも、メチル水銀による脳障害のメカニズムやその性差には不明な点が多い。この研究では、低用量のメチル水銀による新規の脳神経毒性が見出された。これはマウスでの結果であるが、ヒトの低濃度汚染の影響部位の予想にも、哺乳類の神経毒性の性差のメカニズム解明にも寄与する研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Methyl mercury chloride was orally administered to ICR mice.

Administration of half the amount of methylmercury that causes typical toxicity in mice induced oxidative stress, activation of astrocytes, protein expression of aquaporin and edema, specifically in periaqueductal gray matter. The amount of mercury accumulated in this region was similar to that in the cerebral cortex and cerebellum, where the effects of methylmercury toxicity were not observed. These results revealed that the periaqueductal gray matter was particularly vulnerable to methylmercury. We are currently investigating the relationship between sex steroid hormones and sex differences in toxicity to this new toxicity and other neurotoxicity.

研究分野：生化学

キーワード：メチル水銀 アクアポリン 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの神経疾患や神経毒の作用には、性差が見られる。しかし、性差の生じるメカニズムは、不明な点が多い。神経毒であるメチル水銀の毒性を例にとると、C57BL/6 マウスではメスのほうが、Swiss albino マウスではオスのほうが神経毒性が強く表れる。水俣病では、罹患率は男性が1.2倍、死亡率は1.8倍であるが、これはメチル水銀の摂取量の男女差が関連していると言われている。

女性ホルモンであるエストロゲンは、様々な神経毒性や神経疾患に対して強い保護作用を持つ。アルツハイマー症、パーキンソン病、メチル水銀毒性などに対する保護作用が、ラット、マウスの実験などにより、国内外から多数報告されている。エストロゲンは脳内でも合成されている。代表的なエストロゲンであるエストラジオールを例にとると、最近連携研究者川戸は、ラットの脳内エストラジオール濃度は血中よりはるかに高く、オスの脳にはメスより高濃度のエストラジオールが存在する事を明らかにした。さらに申請者はオスの脳で合成されたエストラジオールは脳自身を保護しており、letrozole でその合成を阻害すると、メチル水銀毒性が40%も増悪することを見出した。また、男性ホルモンであるテストステロン(アンドロゲン)による神経保護作用も報告している。

一方、マウス脳内にも、ラットと同程度のエストラジオールが存在する。さらにエストロゲン合成酵素であるアロマターゼはオスのほうが脳での発現量が多く、マウスでも脳内エストラジオール合成に性差がある可能性がある。

ICR マウスではメチル水銀の神経毒性に明確な性差が見られる。メスのほうが脆弱で、投与後早く強い影響を受ける。また、ICR マウスの脳をMRIで観察すると、体重減少や協調運動障害が現れる半分程度のメチル水銀投与量で、脳室の拡大が観察された。我々が見出したこれらの特徴を持つICR マウスを研究対象として、性ホルモンによる神経保護作用を詳しく調べることとした。

2. 研究の目的

当初の研究目的は、マウスを用いて、(1) 脳内エストロゲンやアンドロゲンが、神経保護作用を発揮しているかどうかを明らかにすること(2) 神経毒性の性差の要因として、脳の脆弱性と、そこに脳内性ホルモンがどのように関与しているかを明らかにすること(3) エストロゲンやアンドロゲンの神経保護作用の分子機構の解明であった。そのため、神経毒性メカニズムの情報の多い、メチル水銀を用いて研究を行うこととした。

神経毒性の性差には、脳そのものの脆弱性の性差と、toxicokinetics の性差の両者が関与する。この研究では、脳そのものの脆弱性の性差を検証するために、toxicokinetics の影響を考慮する。水銀の脳内蓄積量をモニターし、メチル水銀の脳への蓄積と脳のダメージの関係を解析することで、脳の脆弱性や性差へのステロイドの寄与などが明確になる。

3. 研究の方法

ICR マウスにメチル水銀を経口投与し、その毒性を(1) MRIによる脳の形態変化(2) 後肢交差、協調運動障害、体重の測定と解析(3) 冠状切片の免疫組織染色による観察(4) 水分含量の定量による浮腫の検証(5) 脳部位ごとから抽出したRNAを用いた、各種mRNAの定量(6) 脳部位ごとの酸化ストレスマーカーの定量などで解析した。また(7) 脳部位ごとの水銀蓄積量の定量も行った。

ICR マウスでは、メスのほうがより少ないメチル水銀投与量で毒性が発現する。そこでまず、低い投与量で見られる毒性の分子機構を追及した。

8週齢のICR マウスに4 mg Hg/kg/day のメチル水銀を連日投与すると、オスでは5週目から、メスでは3 - 4週目から典型的な毒性である体重減少や協調運動障害、後肢交差がみられた。協調運動障害はローターロッドテストで計測した。一方、MRIで観察される脳室の拡大は、投与2週目から生じていた。そこでまず、投与1, 2, 4週目マウスの脳切片を用いて、メチル水銀の影響を明らかにした。

ついで同じ条件で5 - 8週間投与を続け、後肢交差や体重減少等が生じたマウスの脳切片を用いて、この投与量でのメチル水銀の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 脳室拡大メカニズムの追及

メチル水銀を2および4週間投与したマウスの脳をMRIで計測すると、第3脳室と側脳室の体積が2倍以上に拡大していたが、第4脳室の体積は変化しなかった。冠状切片を用いて脳室周囲の組織を計測したが、顕著な委縮は見られなかった。一方、冠状切片の染色像では中脳水道の狭窄が高頻度で見られた。中脳水道の狭窄は、第3および側脳室の拡大を引き起こすが、第4脳室には影響しない。中脳水道は、周囲の組織の膨潤、すなわち浮腫の発生で圧迫されて狭窄することから、周辺組織の水分含量を乾湿重量法で定量した。その結果、中脳水道周囲灰白質のみ、メチル水銀投与量依存的に有意に水分量が増加していた。その外側の中脳域、および隣接する大脳皮質の水分量は変化していなかった。これは、中脳水道周囲灰白質に特異的に浮腫が生じたことを示唆し、それが中脳水道を圧

迫し、狭窄を引き起こしたと考え、脳室拡大の結果と矛盾しない。

(2) 少ないメチル水銀投与量でみられる、中脳水道周囲灰白質の器質的变化

中脳水道周囲灰白質で特異的に浮腫が生じていたことから、浮腫と関連する水チャネルタンパク質であるアクアポリン4の発現を調べた。メチル水銀を2および4週間投与したマウスの冠状切片を免疫組織染色すると、中脳水道周囲灰白質でのみアクアポリン4タンパク質の発現が、メチル水銀投与量依存的に増加していた。real-time RT-PCRでアクアポリン4のmRNA量を定量すると、中脳域でのみメチル水銀投与量依存的に増加しており、それに隣接する大脳皮質では変化が見られなかった。これは、中脳水道周囲灰白質で特異的にアクアポリン4の発現が増加し、それが浮腫の発生と関連している可能性を示す。

アクアポリン4は脳ではアストロサイトに多く発現しており、かつアストロサイトが活性化すると発現量が増加する。そこでアストロサイトの活性化マーカーであるGFAP (Glial fibrillary acidic protein) の免疫組織染色を行ったところ、メチル水銀を投与したマウスでは、中脳水道周囲灰白質の毛細血管周囲で発現量が増加し、かつアクアポリン4と共局在している像が得られた。また、別の活性化マーカーであるS100βタンパク質とGFAPのmRNA量をreal-time RT-PCRで定量すると、どちらも中脳領域でのみ増加していた。

アストロサイトは酸化ストレスによって活性化される。メチル水銀は細胞の酸化ストレスを増加させるという報告がある。そこで脳を部位ごとに切り分け中脳域の酸化ストレス状態を調べることにした。酸化ストレスによる脂質過酸化の指標であるTBARS (チオバルビツール酸反応性物質) を定量すると、メチル水銀投与によって中脳域でのみ増加していた。また酸化ストレス状態で増加する酸化型のグルタチオンGSSG量も中脳域でのみ有意に増加し、さらに抗酸化ストレス酵素である、グルタチオンペルオキシダーゼやスーパーオキシドジスムターゼのmRNA量も中脳域でのみ増加していた。これらは、メチル水銀の2-4週間投与によって、中脳域でのみ酸化ストレスが誘発されたことを示している。

マウスにメチル水銀を投与すると同時に、抗酸化物質であるビタミンEを投与すると、投与2週間後の脳室の拡大が抑制された。この結果は、メチル水銀が中脳域で酸化ストレスを引き起こし、それにより活性化されたアストロサイトがアクアポリン4の発現を亢進して浮腫が生じ、中脳水道が浮腫によって狭窄されて脳室が拡大するという流れが、抗酸化物質による酸化ストレスの軽減によって遮断されたとして説明できる。

(3) 典型的なメチル水銀毒性が見られたマウス脳の器質的变化

(2)に記載した中脳域に特異的な変化は、メチル水銀投与1週間では見られず、2-4週間投与で検出された。ICRマウスにメチル水銀をさらに投与し続けると、5-8週間で、後肢交差などの典型的なメチル水銀毒性が観察された。そのマウスの脳切片を用いて、real-time RT-PCRでアクアポリン4とGFAPのmRNAを定量したところ、大脳皮質と小脳でも、中脳域と同様な増加がみられた。この結果は、典型的なメチル水銀毒性症状が現れたマウスの脳では、大脳皮質や小脳でも器質的变化が生じるが、それより少ない投与量では中脳域にだけ変化が生じることを意味する。

(4) 各脳領域のメチル水銀蓄積量

メチル水銀を2または4週間投与したマウスの中脳水道周囲灰白質、その周囲の中脳組織、大脳皮質、小脳の総水銀濃度を加熱気化原子吸光法により測定した。脳部位ごとの水銀濃度に差異は認められず、中脳水道周囲灰白質の水銀濃度は他の組織と同程度であった。

この結果と(3)の成果を総合すると、中脳水道周囲灰白質は、大脳皮質や小脳に比較してより低い水銀蓄積量で器質的变化が生じることが明らかになった。

(5) 結論

マウスでは、中脳水道周囲灰白質が、大脳皮質や小脳よりもメチル水銀感受性が高く、少ない投与量から影響がでることが明らかになった。中脳水道周囲灰白質は呼吸や発声といった機能に関与しており、水俣病患者に高頻度でみられる構音障害と関連する可能性がある。

マウスを用いた成果ではあるが、低用量のメチル水銀による新規毒性機構の一端が明らかになった。また、この毒性を含めた性差についていくつかの予備実験を行ったが、まだ成果としてまとめられる精度に達していない。今回の研究成果によって性差のターゲットが明らかになったので、この研究は性差の研究に大きく貢献した。今後も性ホルモンの影響を追及していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanaka M, Ishihara Y, Mizuno S, Ishida A, Tsuji M, Vogel CFA, Yamazaki T, Itoh K. . .	4. 巻 496
2. 論文標題 Progression of vasogenic edema induced by activated microglia under permanent middle cerebral artery occlusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun	6. 最初と最後の頁 582-587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.094.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi K. .	4. 巻 1
2. 論文標題 Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0020-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishihara Y, Itoh K, Tanaka M, Tsuji M, Kawamoto T, Kawato S, Vogel CFA, Yamazaki T	4. 巻 7(1):
2. 論文標題 Potentiation of 17 α -estradiol synthesis in the brain and elongation of seizure latency through dietary supplementation with docosahexaenoic acid.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06630-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shishido Y, Baba T, Sato T, Shima Y, Miyabayashi K, Inoue M, Akiyama H, Kimura H, Kanai Y, Ishihara Y, Haraguchi S, Miyazaki A, Rozman D, Yamazaki T, Choi MH, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI.	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential lactate and cholesterol synthetic activities in XY and XX Sertoli cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 41912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep41912.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Itoh Kouichi, Oguro Ami, Chiba Yoichi, Ueno Masaki, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F. A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50377-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Itoh Kouichi, Taniguchi Ruri, Matsuo Taira, Oguro Ami, Vogel Christoph F.A., Yamazaki Takeshi, Ishihara Yasuhiro	4. 巻 708
2. 論文標題 Suppressive effects of levetiracetam on neuroinflammation and phagocytic microglia: A comparative study of levetiracetam, valproate and carbamazepine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134363 ~ 134363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.134363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Sakurai Hikaru, Oguro Ami, Tsuji Mayumi, Vogel Christoph F.A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 193
2. 論文標題 Retinoid X receptor-mediated neuroprotection via CYP19 upregulation and subsequent increases in estradiol synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105421 ~ 105421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2019.105421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lee Jinwoo, Yamazaki Takeshi, Dong Hui, Jefcoate Colin	4. 巻 441
2. 論文標題 A single cell level measurement of StAR expression and activity in adrenal cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 22 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2016.08.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 山崎 岳、石原 康宏	4. 巻 71
2. 論文標題 ニューロステロイドの合成と機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1409208925	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山崎 岳、石原 康宏	4. 巻 24
2. 論文標題 ニューロステロイドの神経保護作用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石原 康宏、山崎 岳	4. 巻 35
2. 論文標題 メチル水銀による神経毒性とグリア細胞への作用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1398-1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 難波貴彦, 本田達也, 石原康宏, 山元恵, 山崎岳
2. 発表標題 メチル水銀によるマウス中脳水道周囲灰白質におけるアクアポリン4発現の亢進
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honda T, Ishihara Y, Ishida A, Yamazaki T
2. 発表標題 Activation of microglia and loss of synapse in the developing hippocampus of mice prenatally treated by valproate
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka M, Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T
2. 発表標題 A role of microglia in the progression of ischemic brain edema
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本田 達也, 山崎 岳, 石原 康宏, 石田 敦彦
2. 発表標題 バルブロ酸胎児期暴露マウスの海馬におけるミクログリアの活性化とシナプスの減少
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 美樹, 石原 康宏, 伊藤 康一, 石田 敦彦, 山崎 岳
2. 発表標題 虚血性脳浮腫におけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石原 康宏、田中 美樹、伊藤 康一、辻 真弓、河本 俊弘、川戸 佳、山崎 岳
2. 発表標題 脳内エストロゲン合成のドコサヘキサエン酸による活性化とてんかん発作の軽減作用
3. 学会等名 第25回 ステロイドホルモン学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石原 康宏、伊藤 康一、馬場 直道、対馬 忠広、三澤 嘉久、山崎 岳
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸による脳内エストロゲン合成活性化の分子機構とてんかん発作軽減作用
3. 学会等名 第60回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 難波貴彦 山元恵 大黒亜美 山崎岳
2. 発表標題 メチル水銀がマウス中脳に及ぼす器質的变化
3. 学会等名 環境省 メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 難波貴彦, 本田達也, 石原康宏, 山元恵, 山崎岳
2. 発表標題 メチル水銀によるマウス中脳水道周囲灰白質 (PAG) におけるアクアポリン4発現の亢進
3. 学会等名 内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石原 康宏 (Ishihara Yasuhiro) (80435073)	広島大学・統合生命科学研究科・准教授 (15401)	
連携研究者	山元 恵 (Yamamoto Megumi) (70344421)	国立水俣病研究センター・基礎研究部・室長 (87401)	
連携研究者	川戸 佳 (Kawato Suguru) (50169736)	順天堂大学・医学部・客員教授 (32620)	