

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09164

研究課題名(和文)脳神経変性疾患に対する有害金属の影響とオレアノール酸配糖体リード治療薬研究

研究課題名(英文) Analysis of toxic heavy metals in neurodegenerative disorders and evaluation of derivatives of oleanolic acid as a therapeutic candidate

研究代表者

高根沢 康一 (Yasukazu, Takanezawa)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：90345257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)やパーキンソン病(PD)等の脳神経変性疾患の発症は、毒物や有害金属などの外部要因が一因と考えられている。我々は低濃度メチル水銀を食事から摂取しており、脳神経変性疾患との関連が推察される。そこで、本研究では、メチル水銀が脳神経変性疾患との関連性について検証すること、オレアノール酸配糖体をリード化合物とした脳神経変性疾患治療薬への応用を目的とした。PDの原因遺伝子であるシヌクレイン高発現細胞は野生型細胞と比較してメチル水銀に対する感受性が高く、シヌクレインとメチル水銀の相互作用が示唆された。また、オレアノール酸配糖体OA3-Gluはメチル水銀による細胞死を軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、パーキンソン病の原因遺伝子であるシヌクレインの高発現細胞細胞はメチル水銀のばく露に対し脆弱であることがわかった。すなわち、パーキンソン病発症後における神経細胞の脱落にメチル水銀のばく露がリスク因子となることが考えられる。また、オレアノール酸配糖体の中でOA3-Gluはメチル水銀の毒性を緩和することを考えると、シヌクレインが蓄積しているパーキンソン病の神経細胞をメチル水銀から保護する化合物となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) causes occur sporadically and it is generally agreed that they could arise through interactions among genetic and environmental factors. Methylmercury (MeHg), a neurotoxic metal, is considered to one of the major environmental hazards for neurodegenerative disorders. In this research project, we investigated whether there is an interaction between MeHg and neurodegenerative disorders. In addition, we tried to create oleanolic acid (OA) 3-orthoester derivatives as anti-AD or anti-PD drug candidates. We found that overexpression of  $\alpha$ -synuclein showed high sensitivity to MeHg compared to wild type cells. Treatment of OA-3-glucoside attenuated MeHg-induced  $\alpha$ -synuclein-overexpressed cell death.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：メチル水銀 パーキンソン病 オレアノール酸配糖体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 1. 研究開始当初の背景

#### (1)メチル水銀と脳神経変性疾患

メチル水銀は、水俣病の原因物質として知られる環境汚染物質であり、毒性の主な標的臓器は脳神経系である。現在、我が国では水俣病のような高濃度のメチル水銀汚染はないが、水銀は火山活動・化石燃料の燃焼などにより環境中に放出され、地球環境を循環している。その過程で微生物によりメチル化されてメチル水銀となる。メチル水銀は食物連鎖により生物濃縮され、マグロ等の高次消費者に蓄積しており、魚介類を多食するわが国においては、低濃度のメチル水銀ばく露を受け続けている。魚介類摂取による低濃度メチル水銀ばく露の胎児・小児発達をはじめヒトへの影響が危惧されている。さらに、近年低濃度メチル水銀の胎児への影響に加え、脳変性疾患の発症あるいは進展の潜在的リスクが懸念されている。申請者らは低濃度メチル水銀によるオートファジーの役割とその機能 (Takanezawa Y. *et al.* Toxicol. Lett. PMID: 27667695)、小胞体ストレス (Takanezawa Y. *et al.* Toxicol. Lett. PMID: 30769081) に注目し、低濃度メチル水銀により増加するユビキチン化タンパク質がその毒性の一因である可能性を示してきた (Takanezawa Y. *et al.* Sci. Rep. PMID: 29196648)。一方、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) などの脳神経変性疾患の多くは、ユビキチン化された封入体が病変部位の神経細胞内に出現するのが特徴である。これらの知見からユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こす低濃度メチル水銀は脳神経変性疾患の発症あるいは進展に関わっていると考えられ、メチル水銀毒性の軽減は脳神経変性疾患の治療につながる可能性があると考えられた。

#### (2) オレアノール酸誘導体

サポニンはトリテルペンまたはステロイド配糖体を基本骨格とし、様々な生理活性を有する。申請者らはオンジサポニンの神経保護作用に着目し、メチル水銀毒性緩和作用を有する生薬由来サポニン化合物の探索を行ってきた。その中で、オレアノール酸をアグリコンとするオレアノール酸 3-グルコシド (OA3Glu) が *in vitro* 及び *in vivo* 実験においてメチル水銀の毒性を緩和する結果を示し、新たな作用点を持つ抗メチル水銀薬となる可能性がある。低濃度メチル水銀によって惹起あるいは増悪する脳神経変性疾患の治療薬への有用性に着目した。

### 2. 研究の目的

低濃度メチル水銀のばく露による AD、あるいは PD への影響の有無を調べることで、抗メチル水銀活性を有する OA3Glu の作用点の解明、および OA3Glu に結合する糖鎖の種類や結合様式を検討し、更なる活性増強を検証することを目的とし、(1) メチル水銀の AD 及び PD 疾患発症への影響と作用機序の解明、(2) OA3Glu の AD 及び PD 疾患治療薬としての効果を評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) メチル水銀の AD 及び PD 疾患発症への影響と作用機序の解明

シヌクレインタンパク質の発現が高い細胞では、メチル水銀に対しどのような影響を及ぼすのかを検証する。パーキンソン病では病変部位の神経細胞内にシヌクレインが蓄積する。そこで、シヌクレイン高発現細胞モデルとしてヒト神経芽細胞株である SH-SY5Y 細胞にシヌクレインを安定発現させた細胞株 (以下、*-syn* OE 細胞) を樹立した。通常の培養条件下において、*-syn* OE 細胞と対照細胞における細胞増殖速度、細胞形態にほとんど差異が認められないことを確認し、ウエスタンブロット法によりシヌクレインの発現を確認した。次に、*-syn* OE 細胞と対照細胞のメチル水銀に対する感受性を MTT 法で評価した。さらに、オートファジーおよび小胞体ストレスの進行・活性化に関わる分子群の発現をリアルタイム PCR 法で評価した。オートファジーの活性化の指標となる LC3 および p62 の発現をウエスタンブロット法により評価した。

#### (2) OA3Glu の AD 及び PD 疾患治療薬としての効果

OA3Glu 糖鎖誘導体を配糖体化と脱保護の連続反応を行い、作業工程を短縮化したマイクロフローリアクターにより行った。得られた OA3Glu 糖鎖誘導体の抗メチル水銀作用は SH-SY5Y 細胞を用いた MTT 法により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1)メチル水銀の AD 及び PD 疾患発症への影響と作用機序の解明

脳神経変性疾患に共通する特徴は、神経細胞内にユビキチン化された異常タンパク質の蓄積である。細胞にはプロテアソームやオートファジーといった異常タンパク質を分解除去するシステムが機能することで細胞内の恒常性が維持されている。申請者らは、オートファゴソーム形成を担う LC3 やユビキチン結合能を持つアダプタータンパク質 p62 がメチル水銀のばく露により発現が増加し、オートファジーが活性化すること、このシステムがメチル水銀により増加するユビキチン化の蓄積を防ぐ、細胞防御機構であることを明らかにしてきた。また、メチル水銀のばく露により小胞体ストレスもほぼ同時に活性化し、オートファジーの活性化につながることも変性タンパク質の蓄積を防ぐ役割を担い、メチル水銀に対する細胞防御機構の一つであることが示唆されている。しかし、メチル水銀を含めた環境汚染物質が脳神経変性疾患のリスクとなる

のではないかという疫学的な示唆があるものの両者の関連性は不明なままであった。これらの疑問点を明らかにするため、まず、低濃度メチル水銀のばく露によるアルツハイマー病 (AD) の原因物質であるアミロイド タンパク質、あるいはパーキンソン病 (PD) の原因物質である シヌクレインタンパク質の合成、分泌を評価した。しかしながら、メチル水銀ばく露によるアミロイド タンパク質、 シヌクレインの発現は神経系培養細胞およびマウス単回投与の脳においてそれぞれ有意な合成、分泌の促進作用は得られなかった。次に、PD の原因物質である シヌクレインを SH-SY5Y 細胞に安定発現させた細胞株を樹立し、PD 細胞のモデルとしてメチル水銀に対する影響について解析を進めた。 シヌクレインやユビキチン化タンパク質などの凝集体は p62 などのユビキチン結合能を持つアダプタータンパク質によってオートファジーによって排除される。そこで、まず通常培養条件下における LC3 と p62 の発現をウエスタンブロット法で調べた。その結果、対照細胞と比較して両者の発現量に有意な差は認められなかった。次に 0.5  $\mu\text{M}$  のメチル水銀を 24 時間処理後の LC3 と p62 の発現をウエスタンブロット法で調べたところ、LC3-II の発現が対照細胞と比較して有意に増加していた。一方、p62 はほとんど差異がなかった。続いて、 -syn OE 細胞と対照細胞にメチル水銀を処理し、オートファジーと小胞体ストレス関連遺伝子 (合計 40 遺伝子) の経時的な発現をリアルタイム PCR 法により評価した。その結果、メチル水銀処理 4 時間後に -syn OE 細胞において小胞体ストレスによって誘導される GADD34 遺伝子が対照細胞と比較して有意に増加しており、12 時間後においても顕著であった。一方、CHOP 遺伝子の発現は対照細胞の方が強く誘導されていた。一方で、オートファジー関連遺伝子群の遺伝子発現は -syn OE 細胞と対照細胞で顕著な差異は認められず、 -syn OE 細胞における LC3 の発現誘導も対照細胞と比較して差異はなかった。これらの結果は、細胞内の過剰な シヌクレインの存在下においてメチル水銀の毒性が強く影響を及ぼすことを示唆しており、パーキンソン病に対しメチル水銀が増悪因子となることを示す意義深いものである。

## (2) OA3Glu の AD 及び PD 疾患治療薬としての効果

我々の先行研究において、OA3Glu の抗メチル水銀活性にはオレアノール骨格が必須であること、骨格 3 位の糖が重要であることを明らかにしている。本研究では、糖鎖の種類、糖鎖の結合様式 (3 位と 28 位の糖鎖付加等) に着目し、設計・合成を行った。OA3Glu の 3 位の糖鎖をガラクトース、マンノース、キシリトース、アラビノースとした OA3Man、OA3Gla、OA3Xyl、OA3Ara および 3 位と 28 位にグルコースが結合した OA3,28Glu を合成した。それぞれの化合物は 1, 2.5, 5  $\mu\text{M}$  の濃度で前処理し、抗メチル水銀活性を MTT 法により検証した。その結果、OA3Glu と同様に OA3Man、OA3Gla はすべての濃度で抗メチル水銀活性を示した。一方、OA3Xyl、OA3Ara は 1  $\mu\text{M}$  では抗メチル水銀活性を示したが、それ以外の高濃度処理では細胞毒性を示した。また、OA3,28Glu の抗メチル水銀活性は僅かであった。細胞内へのメチル水銀取り込み阻害活性を調べたところ、OA3Glu は細胞内のメチル水銀濃度を減少させたのに対し、OA3,28Glu による取り込み阻害は認められなかった。以上の結果から、オレアノール酸の C3 位の糖鎖の種類は抗メチル水銀活性に与える影響は僅かであること、28 位の糖鎖は OA3Glu のメチル水銀取り込み阻害を妨げることがわかった。

今回の研究から、 シヌクレインの過剰存在下におけるメチル水銀のばく露が、オートファジーや小胞体ストレスの増加につながり、神経細胞死を引き起こすことが示唆された。すなわち、メチル水銀がパーキンソン病の増悪因子となることが考えられる。オートファジーや小胞体ストレスは細胞死を回避する防御機構であるが、一方で過剰な活性化は細胞死に向かわせることが報告されており、この過剰な活性化が シヌクレインとメチル水銀による細胞死の原因なのかもしれない。

我々は低濃度のメチル水銀を食事から摂取しており、このメチル水銀を速やかに排出あるいは吸収阻害することがパーキンソン病の増悪を防ぐことにつながる。OA3Glu は、メチル水銀の細胞内取り込みを阻害する活性を有しており、抗メチル水銀薬であると共にパーキンソン病の予防薬となる可能性を示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takanezawa Y, Nakamura R, Sone Y, Uruguchi S, Kiyono M	4. 巻 2
2. 論文標題 An autophagy deficiency promotes methylmercury-induced multinuclear cell formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research	6. 最初と最後の頁 460-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.084.	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 -
1. 著者名 Nakamura R, Shirahata T, Konishi N, Takanezawa Y, Sone Y, Uruguchi S, Kobayashi Y, Kiyono M	4. 巻 1
2. 論文標題 Oleanolic acid 3-glucoside, a synthetic oleanane-type saponin, alleviates methylmercury toxicity in vitro and in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tox.2019.02.006.	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 -
1. 著者名 Takanezawa Y, Nakamura R, Hamaguchi M, Yamamoto K, Sone Y, Uruguchi S, Kiyono M	4. 巻 15
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid enhances methylmercury-induced endoplasmic reticulum stress and cell death and eicosapentaenoic acid potentially attenuates these effects in mouse embryonic fibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 35-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2019.02.009.	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 -
1. 著者名 Takanezawa Y, Nakamura R, Kojima Y, Sone Y, Uruguchi S, Kiyono M	4. 巻 6
2. 論文標題 Cytochalasin E increased the sensitivity of human lung cancer A549 cells to bortezomib via inhibition of autophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research	6. 最初と最後の頁 603-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.03.029.	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 -

1. 著者名 Takanezawa Y, Nakamura R, Harada R, Sone Y, Uraguchi S, Kiyono M	4. 巻 7
2. 論文標題 Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17112-8.	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、岩井孝志、小林義典、田辺光男、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀による神経伝達障害に対するオレアノール酸 3-グルコシドの効果
3. 学会等名 日本薬学会 第139回
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 高根沢康一、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀の細胞毒性に対する高度不飽和脂肪酸(DHAとEPA)の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第139回
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 高根沢康一、原田遼平、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀応答における p62 と Nbr1 の発現解析
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀毒性に対するオレアノール酸3位オルトエステル体の効果
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 高根沢康一、原田遼平、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子
2. 発表標題 低濃度メチル水銀毒性防御におけるSquestosome1/p62の役割とユビキチン化タンパク質クリアランス
3. 学会等名 日本薬学会 第138回
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 中村亮介、高根沢康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子
2. 発表標題 オレアノール酸サポニン誘導体による抗メチル水銀活性の評価
3. 学会等名 日本薬学会 第138回
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 高根沢康一、原田遼平、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀によるMAPキナーゼの活性化とオートファジー誘導
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 原田遼平、高根沢康一、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子
2. 発表標題 メチル水銀によるユビキチン結合タンパク質p62の発現誘導と防御機構の解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Yasukazu Takanezawa, Ryosuke Nakamura, Yuka Sone, Shimpei Uraguchi, Masako Kiyono
2. 発表標題 Autophagy and sequestosome1/p62 play a protective role against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity
3. 学会等名 Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部 公衆衛生学教室 <a href="http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/">http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/</a>
--

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