

平成22年11月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510065
 研究課題名（和文）メチル水銀は児脳における甲状腺ホルモンの活性化を阻害し脳の発達を阻害する？
 研究課題名（英文）Is inhibition of thyroid hormone activation involved in methylmercury toxicity in the developing brain?
 研究代表者
 吉田 克己 (YOSHIDA KATSUMI)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：90166942

研究成果の概要（和文）：メチル水銀の中枢神経毒性発現機序に脳内の甲状腺ホルモン作用の阻害が関与する可能性について検討した。ラット胎児脳より調整したアストロサイトをメチル水銀存在下で培養し、2型（D2）および3型（D3）甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の活性、遺伝子発現、タンパク発現を検討した。メチル水銀は D2 および D3 の遺伝子およびタンパクの発現には影響しなかったが、活性を阻害することで脳内の T3 濃度を変化させ脳の発育に障害をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the association of MeHg toxicity with deiodinases which regulate activation (D2) and inactivation (D3) of thyroid hormone by using cultured rat astrocytes or a human breast cancer cell line MCF-7. MeHg significantly inhibited D2 and D3 activity. However, it did not affect the expression of D2 and D3 mRNA and protein. These results indicate that MeHg may disturb normal brain development through D2 and D3 inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：メチル水銀、甲状腺ホルモン、脱ヨード酵素

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は中枢神経毒性の強い環境汚染物質である。このような環境汚染物質の取り扱い、排出に対する規制が強化された現在では、水俣病に代表される大規模なメチル水銀中毒が発生する可能性は極めて低くなったものの、メチル水銀は食物、特に魚介類を

通じて人体に摂取されることから、海産物を食する機会が多い本邦では微量のメチル水銀に曝露され続けていると言え、その健康への影響を明らかにすることは極めて重要である。食を介して摂取される微量のメチル水銀が子供の脳の発育にどのように影響するかについては、日本と同様に魚介類を多食す

るセイシェル、フェロー諸島などで疫学調査が継続して行なわれているが、影響があるとする報告とないとする報告があり、現時点でははっきりとした結論は出ていない。

メチル水銀はSH基に対する親和性が非常に強く、同基を活性中心に有する各種の酵素活性を阻害する。また活性中心にセレンシステインを有するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)を阻害すると共に、細胞内のグルタチオン(GSH)と結合することで、細胞内酸化ストレスの除去が損なわれる。これらがメチル水銀の中樞神経毒性発現に関与すると考えられているが、未だ毒性発現機序については不明な点が多い。

甲状腺ホルモンは臓器、特に中枢神経系の発育に極めて重要であり、ヨード欠乏や甲状腺形成障害による先天性甲状腺機能低下症が子の知能障害や行動異常をもたらすことは良く知られている。甲状腺ホルモン作用の発現には標的臓器内の甲状腺ホルモン濃度が適切なレベルに保たれることと甲状腺ホルモン受容体などの情報伝達系が正しく機能することが必要である。細胞内の甲状腺ホルモン濃度の制御には甲状腺ホルモントランスポーター、甲状腺ホルモン脱ヨード酵素などが関与する。脱ヨード酵素には現在3種類のアイソザイムが同定されているが、中枢神経系にはT4をT3に変換する、即ち甲状腺ホルモンを活性化する2型脱ヨード酵素(D2)と、T4をrT3、T3をT2に変換する、即ち甲状腺ホルモンを不活性化する3型脱ヨード酵素(D3)が存在し、活性型甲状腺ホルモンであるT3の細胞内濃度を適切に保つためにはこれらの酵素が重要な役割を演じていると考えられている。

先天性甲状腺機能低下症は胎児期のメチル水銀曝露で認められるような中枢神経系(特に小脳)の構造異常をきたす。メチル水銀曝露動物では甲状腺ホルモン産生が阻害されることが知られているが、脳内T3レベルの制御に重要な脱ヨード酵素は活性中心にセレンシステインを有することから、メチル水銀による中枢神経毒性発現には血中甲状腺ホルモン濃度の低下のみならず、脳内の甲状腺ホルモンの代謝、特にその活性化、不活性化の変化が関与する可能性が考えられる。そのような観点からわれわれはメチル水銀の脱ヨード酵素活性に及ぼす影響を検討してきた。胎児期のメチル水銀曝露は胎児脳のD3活性の低下をもたらした(Environ Res 80:208,1999)。また中枢神経系由来の細胞株において、メチル水銀はD2活性を抑制することを明らかにした(Toxicol Lett 161:96, 2006)。これらの結果は脱ヨード酵素活性の変化が脳内T3濃度を変化させ、脳の発育障害につながる可能性を示唆するものであるが、実際に脱ヨード酵素活性の変化により甲

状腺ホルモン応答性遺伝子の発現が変化するかは明らかではなかった。そこで甲状腺ホルモン応答性遺伝子の一つである成長ホルモン(GH)を産生する下垂体由来細胞株を用いてメチル水銀曝露の影響を検討したところ、D2活性の低下と共にGH産生量の減少を認めた(Toxicology 237:203, 2007)。この結果はメチル水銀が脱ヨード酵素活性の変化を通じて甲状腺ホルモン作用の発現に影響する可能性を示すものであり、中枢神経系においてもメチル水銀曝露の脱ヨード酵素活性、甲状腺ホルモン応答性に対する影響を明らかにする必要があるが生じた。

2. 研究の目的

メチル水銀が中枢神経系において脱ヨード酵素および甲状腺ホルモン応答性遺伝子群の発現にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。このことを通じてメチル水銀の中樞神経毒性機序の解明に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系由来細胞株における甲状腺ホルモン応答性の検討: 中枢神経系における甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてグリア線維性酸性タンパク(GFAP)、ミエリン塩基性タンパク(MBP)、ニューログラニン(RC3)が知られている。T3で刺激した中枢神経系細胞株におけるこれらの発現をPCR、western blot法、免疫染色で検討する。

(2) 脱ヨード酵素の検討: ラット胎児脳より調整したアストログリアをメチル水銀存在下で培養し、D2およびD3の酵素活性をカラムクロマトグラフィーもしくはRIAで、遺伝子発現を定量RT-PCRで検討する。カドミウムの脱ヨード酵素に対する影響をメチル水銀のそれと比較検討する。

(3) 細胞内情報伝達系の検討: アストロサイトをメチル水銀存在下で培養し、細胞内情報伝達系の活性化をwestern blot法で検討する。

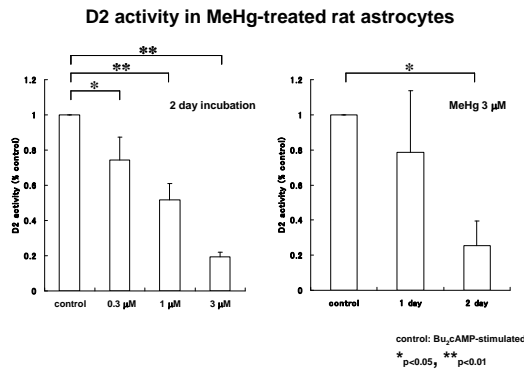
4. 研究成果

(1) 中枢神経系由来細胞株における甲状腺ホルモン応答性の検討: GFAP、MBP、RC3を発現する各種中枢神経系細胞株を入手しT3応答性を検討したが、いずれの細胞株もT3応答性を喪失していた。また胎児脳からGFAPを発現するアストロサイトとMBPを発現するオリゴデンドログリアを調整したが、前者ではGFAPのT3に対する応答性が弱いこと、また後者では脱ヨード酵素の検討に必要な細胞数を確保するには大量の胎児脳が必要であることも明らかになった。以上のことから甲状腺ホルモン応答性遺伝子発現に対するメチル水銀の影響を検討するのは現時点では困難と判断し、メチル水銀の脱ヨード酵素

への影響の解析を中心に研究を進めることとした。

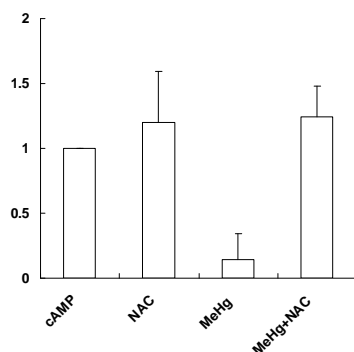
(2) 脱ヨード酵素の検討：培養アストロサイトにメチル水銀を負荷し、D2、D3の酵素活性、遺伝子およびタンパク発現を検討した。

① D2：既報(Toxicol Lett 161:96, 2006、Toxicology 237:203, 2007)と同様にメチル水銀は D2 活性を濃度および時間依存性に抑制した (図 1)。



このことからメチル水銀は D2 活性を阻害することで、アストロサイトにおける T3 の産生を、ひいては脳内の T3 レベルを減少させ、脳の発育に影響する可能性が示唆された。しかし D2 活性の阻害がどのような影響をもたらすのかは、前述のように甲状腺ホルモン応答性遺伝子と考えられている遺伝子群の T3 応答性を見るのが困難であったため、今回の検討で明らかにすることはできなかった。

メチル水銀に加えてカドミウムも D2 活性を阻害した。メチル水銀は脱ヨード酵素の活性中心にあるセレノシステインに高い親和性をもって結合するため、既報(Toxicol Lett 161:96, 2006)でも考察したように、これにより酵素活性が阻害されるものと考えられた。一方カドミウムではそのような機序は考えにくい。メチル水銀もカドミウムも細胞内酸化ストレスを増大し細胞を障害することが知られているため、細胞内ストレスの関与を検討したところ、N-acetyl cysteine(NAC)で前処視した細胞ではメチル水銀による D2 活性阻害が抑制された (図 2)。



このことからメチル水銀による D2 活性の阻

害に細胞内酸化ストレスが関与する可能性も新たに考えられた。

次いで重金属の D2 遺伝子発現に及ぼす影響を定量 RT-PCR で検討したが、明らかな影響を認めなかった。さらにメチル水銀は D2 タンパク発現量にも影響しなかった。

以上のことから、メチル水銀による D2 活性の阻害は酵素タンパクの発現量の低下によるものではなく、酵素タンパクの活性中心への結合、もしくは細胞内酸化ストレスの増加を介するものと考えられた。

② D3：メチル水銀は D3 遺伝子の発現に影響しなかった。D3 酵素活性はあるもののフォルボールエステルで刺激をした細胞においても活性が不十分であったため、アストロサイトでの検討は困難と考えられた。そこで D3 を発現するヒト乳癌由来細胞 MCF-7 においてメチル水銀の D3 活性に及ぼす影響を検討したところ、メチル水銀は D3 活性を抑制した。これは過去の in vivo の実験結果(Environ Res 80:208,1999)を支持するものであった。

(3) 細胞内情報伝達系：細胞内ストレスにより活性化される情報伝達系の活性化を western blot 法で検討した。検討した ASK1、JNK、p38MAPK、ERK1/2 のうち、メチル水銀で処理をしたアストロサイトで活性化されていたのは ERK1/2 であった。

(4) まとめ：T3 の細胞内濃度維持に重要な D2、D3 へのメチル水銀の影響を詳細に検討した本研究は独創性が高くかつ重要なものである。今後もメチル水銀の中枢神経毒性発現機序に脳内 T3 濃度の変化が関与する可能性を継続して検討する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 岩瀬裕章、竹田真由、吉田克己、中川吉則、平林佐依子、尾崎 泰、高橋友里恵、伊藤貞嘉、森 弘毅、メチル水銀のラット星状膠細胞における 2 型脱ヨード酵素活性および遺伝子発現に及ぼす影響、第 53 回日本甲状腺学会、長崎、2010 年 11 月 12 日
- ② 竹田真由、岩瀬裕章、森 弘毅、尾崎 泰、中川吉則、平林佐依子、伊藤貞嘉、吉田克己、重金属の 2 型脱ヨード酵素遺伝子発現に及ぼす影響、第 20 回日本内分泌学会東北地方会、仙台、2010 年 4 月 24 日
- ③ 半沢雄助、森 弘毅、中川吉則、平林佐依子、尾崎 泰、伊藤貞嘉、吉田克己、メチル水銀はアストロサイトの 3 型脱ヨ

一ド酵素遺伝子の発現を誘導する、第2
5回甲状腺病態生理研究会、東京、2009
年1月31日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 克己 (YOSHIDA KATSUMI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90166942

(2) 研究分担者

森 弘毅 (MORI KOUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80301050

(3) 連携研究者

()

研究者番号：