

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460170

研究課題名(和文)メチル水銀が示す脳選択的毒性に対するセクレトグロビンの役割

研究課題名(英文) Involvement of brain-specific induction of secretoglobin expression in methylmercury toxicity

研究代表者

高橋 勉 (Takahashi, Tsutomu)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00400474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メチル水銀曝露したマウスにおいて、脳組織での病理変化が認められる前に、脳特異的にセクレトグロビンSCGB3A1が発現誘導されることを見出した。また、マウス神経前駆細胞を用いた検討により、SCGB3A1が細胞外からの作用によってメチル水銀の毒性を軽減することも明らかとなった。さらに、転写因子NF- κ BおよびTCF3がメチル水銀によるSCGB3A1の発現誘導に関与することも判明した。以上の結果から、NF- κ B/TCF3を介したSCGB3A1の発現誘導がメチル水銀毒性に対する生体防御システムとして重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the changes in gene expression levels in various tissues of methylmercury (MeHg)-treated mice and found that MeHg induced brain-specific expression of secretoglobin SCGB3A1. We also found that knockdown of SCGB3A1 increased the toxicity of MeHg in mouse neural progenitor C17.2 cells. Moreover, addition of recombinant SCGB3A1 to culture medium decreased the toxicity of MeHg in C17.2 cells, suggesting that extracellular SCGB3A1 plays a key role in the defense mechanism against toxicity of MeHg. Furthermore, NF- κ B and TCF3, transcription factors, were involved in MeHg-induced SCGB3A1 expression.

研究分野：分子毒性学

キーワード：メチル水銀 セクレトグロビン 転写因子

1. 研究開始当初の背景

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、環境中の有機水銀の大部分を占める。環境中の無機水銀がメチル化され生じたメチル水銀は脂溶性が高く生物濃縮を受けやすいため、食物連鎖の上位に位置する大型の魚類の筋肉中に比較的高濃度に蓄積する。メチル水銀は血液脳関門を容易に通過して脳中に蓄積して神経細胞に障害を与え、四肢のしびれ、言語障害、運動失調、視野狭窄、難聴などの症状を特徴とするハンター・ラッセル症候群を引き起こす。また、メチル水銀は胎盤も比較的容易に通過し、未発達な胎児の脳に影響を与える。近年、メチル水銀に関する疫学調査によって、妊婦の魚類を介したメチル水銀の過剰摂取が胎児の脳の発育に影響を与えることが報告され、日本をはじめとする多くの国で妊婦および乳幼児を対象に大型魚類の摂取制限勧告が出されるなど、世界的な社会問題となっている。そのため2013年10月に国連環境計画会議において「水銀に関する水俣条約」が採択され、年間2,000トンにもものぼる水銀の環境中排出を抑制するための世界的な取り組みが開始されている。しかしながら、水俣病が発症して半世紀以上経った現在でも、メチル水銀毒性発現機構およびそれに対する防御機構はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本申請者は、メチル水銀投与によるマウス脳組織中での遺伝子の発現変動をDNAマイクロアレイ法によって解析し、セクレトグロビン (Secretoglobulin: SCGB) ファミリーに属するSCGB3A1の遺伝子発現がメチル水銀投与によって脳特異的に上昇することを明らかにしている。これまでにメチル水銀とSCGBとの関連性を検討した報告はない。本研究では、メチル水銀によるSCGB3A1の発現誘導とその毒性学意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)メチル水銀を投与したマウスにおける遺伝子発現変動

8週齢雄性のC57BL/6マウスに、10mg/kg/dayのメチル水銀を1日1回ずつ7日間連続投与、または25mg/kgのメチル水銀を単回投与した。メチル水銀を投与したマウスから各組織(小脳、大脳、腎臓および肝臓)を摘出し、各遺伝子の発現レベルを定量PCR法によって解析した。また、マウス脳組織のパラフィン切片を作製し、MBL社のRNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit (超高感度RNA *in situ* ハイブリダイゼーション試薬)を用いて *in situ* hybridizationを行った。なお、プローブはAdvanced Cell Diagnostics (ACD)社の蛍光標識Z型プローブ (NeuN probe, Probe-Mm-Rbfox3-C2; SCGB3A1 probe, Probe - Mm-SCGB3A1-C1)を

用いた。さらに、マウス脳組織のパラフィン切片を、抗NeuN抗体を用いて免疫染色を行い、NeuN陽性細胞を検出した。

(2)マウス神経前駆細胞(C17.2細胞)のメチル水銀に対する感受性

C17.2細胞(1×10^4 cells/well)を96-well plateに播種し、24時間培養後、塩化メチル水銀溶液 (final: 0~10 μ M)を添加した。24時間後アラマールブルーアッセイによって細胞生存率を測定した。siRNAは、HiPerfect Reagent (Qiagen)を用いたリバーストランスフェクション法によってC17.2細胞に導入した。また、recombinant SCGB3A1 (Phe21-Gly104) (R&D system)は、メチル水銀処理の1時間前に培地中に添加した。

(3)メチル水銀を投与したマウス脳において活性化される転写因子の検索

25mg/kgのメチル水銀を単回投与したマウスの脳組織から核抽出液を調製し、345種類の転写因子の活性を調べることが出来るProtein/DNA Arrays (Affymetrix)を用いて、メチル水銀によって活性化される転写因子を検索した。

4. 研究成果

(1)マウスへのメチル水銀投与が引き起こす脳の病理変化とSCGB3A1との関係

マウスへのメチル水銀投与による脳の病理変化とSCGB3A1発現誘導との関係を検討した。10~25mg/kgのメチル水銀をマウスに単回投与して5日後のマウスの各組織におけるSCGB3A1のmRNAレベルを調べたところ、肝臓および腎臓ではSCGB3A1の発現レベルはほとんど変動しなかったが、小脳および大脳においてSCGB3A1の発現レベルの有意な上昇が認められた。次に、25mg/kgのメチル水銀を単回投与した後のマウスの小脳および大脳におけるSCGB3A1のmRNAレベルの経日変化を定量PCR法によって調べたところ、投与後1日目で最も高いmRNAレベルを示した。なお、本条件でメチル水銀を投与したマウスの各組織における水銀濃度を調べたところ、投与後1日目において、水銀は小脳および大脳よりも肝臓および腎臓中に多く蓄積していた。また、*in situ* hybridization法によってメチル水銀を投与した1日後のマウスの脳組織におけるSCGB3A1の発現レベルを調べたところ、小脳および大脳(海馬、大脳新皮質)においてSCGB3A1の発現上昇が確認された。次に、メチル水銀を単回投与したマウスの脳組織における病理変化を神経細胞マーカーであるNeuN (Feminizing Locus on X-3; Fox-3)の陽性細胞数を指標として調べた。その結果、小脳においてはメチル水銀投与後7日目でもNeuN陽性細胞数に変化は認められなかったが、大脳においては7日目にNeuN陽性細胞数の軽微な減少が観察された。したがって、マウスの脳中ではメ

チル水銀による障害が認められる前に SCGB3A1 が発現誘導されると考えられる。

(2)メチル水銀毒性に与える SCGB3A1 の影響

(2)-1.メチル水銀によって SCGB3A1 が発現誘導される培養細胞株の特定

メチル水銀によって SCGB3A1 の発現が上昇する細胞種を探すため、3 つのマウス培養細胞（神経前駆細胞: C17.2 細胞, ミクログリア: BV2 細胞, 神経芽細胞腫: NB2a 細胞）を 10 μ M のメチル水銀で処理し、SCGB3A1 の発現変動を調べた。その結果、C17.2 細胞においてメチル水銀による SCGB3A1 mRNA レベルの上昇が認められた。また、BV2 細胞においてもメチル水銀による SCGB3A1 mRNA レベルの上昇が見られたもののその程度はわずかであった。一方、NB2a 細胞では SCGB3A1 の発現誘導は認められなかった。したがって、本研究では C17.2 細胞を用いてメチル水銀による SCGB3A1 発現誘導機構について解析することにした。

(2)-2. C17.2 細胞においてメチル水銀が SCGB3A1 の発現レベルに与える影響およびメチル水銀毒性との関係

C17.2 細胞においてメチル水銀が SCGB3A1 の発現レベルおよび細胞生存率に与える影響について調べた。その結果、メチル水銀処理によって 30 分後から SCGB3A1 の mRNA レベルが上昇し、その後、経時的に低下した。一方、トリパンプルーアッセイによって細胞の生存率を測定したところ、メチル水銀処理 3 時間まではほとんど変化なく、6 時間後から低下が認められた。したがって、マウスと同様に C17.2 細胞においても、メチル水銀による SCGB3A1 発現レベルの上昇は細胞毒性が現れるよりも前に起こると考えられる。

(2)-3. SCGB3A1 のノックダウンが C17.2 細胞のメチル水銀に対する感受性に与える影響

SCGB3A1 とメチル水銀毒性との関係を明らかにするため、siRNA を用いた SCGB3A1 の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響を検討した。SCGB3A1 に対する siRNA を導入した細胞は control siRNA を導入した細胞よりも高いメチル水銀感受性を示した。したがって、SCGB3A1 はメチル水銀毒性に対して防御的な作用を有していると考えられる。

(2)-4. リコンビナント SCGB3A1 の培地中への添加が C17.2 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

SCGB3A1 は全長 104 a.a. から成る低分子量の蛋白質で、N 末端に存在するシグナルペプチド配列 (1-21 a.a.) がプロセッシングを受けた後に細胞外に分泌されると考えられている。そこで、C17.2 細胞を用いてリコンビナント SCGB3A1 (22-104 a.a.) の培地中への添加がメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、リコンビナント SCGB3A1 の培地中への添加によって、メチル水銀の毒性は部分的に軽減された。したがって、SCGB3A1 が示すメチル水銀毒性軽減作用は、細胞外に

分泌された SCGB3A1 による可能性が考えられる。

(3)メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導機構解析

(3)-1. 転写阻害剤がメチル水銀による SCGB3A1 mRNA レベルの上昇に与える影響

C17.2 細胞においてメチル水銀によって SCGB3A1 mRNA レベルが上昇することが確認された。この mRNA レベルの上昇には、転写反応の促進もしくは mRNA の安定性の増大が関与している可能性が考えられる。そこで、転写反応の抑制が、メチル水銀による SCGB3A1 mRNA レベル上昇に与える影響を調べた。その結果、転写阻害剤であるアクチノマイシン D で細胞を処理することによって、メチル水銀による SCGB3A1 mRNA レベルの上昇が認められなくなった。したがって、C17.2 細胞において、メチル水銀は SCGB3A1 の転写反応を促進させることによって、その mRNA レベルを上昇させると考えられる。

(3)-2. メチル水銀による SCGB3A1 発現誘導における MAP キナーゼの関与

SCGB3A1 発現誘導に MAP キナーゼ (p38 および ERK) が関与することが知られている。メチル水銀が p38 および ERK シグナル経路に与える影響を検討したところ、メチル水銀によって p38 および ERK のリン酸化の亢進が認められた。しかしながら、C17.2 細胞を p38 阻害剤 (SB203580) および ERK 阻害剤 (PD98059) で前処理してもメチル水銀による SCGB3A1 発現レベルの上昇はほとんど影響を受けなかった。したがって、メチル水銀は MAP キナーゼシグナル経路を活性化するものの、その活性化はメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導には関与していないと考えられる。

(3)-3. メチル水銀による SCGB3A1 発現誘導機構への NF- κ B の関与

本申請者は、炎症性蛋白質の発現誘導に関わる転写因子 NF- κ B が、メチル水銀によって活性化されることが明らかにしている。SCGB3A1 も抗炎症反応に関わる蛋白質であり、また、SCGB3A1 のプロモーター上には NF- κ B の結合サイトも存在していることから、メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導機構に NF- κ B が関与している可能性も否定できない。そこで、NF- κ B のサブユニットの一つである p65 をノックダウンしたところ、メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導が一部抑制された。また、メチル水銀処理によって NF- κ B の核内レベルが上昇することも確認された。さらに、SCGB3A1 遺伝子のプロモーター領域への NF- κ B の結合を protein-DNA binding assay [ビオチン標識した SCGB3A1 のプロモーター領域 (+1~-1,000 bp) に結合する蛋白質をストレプトアビジンビーズを用いて回収して、抗 p65 抗体を用いた immunoblotting で検出する方法] によって検討した。その結果、SCGB3A1 プロモーター

上への p65 の結合量がメチル水銀によって増加することが示された。これらの結果から、メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導機構の一部に NF- κ B の活性化が関与していると考えられる。

(3)-4.メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に関わる転写因子の検索

メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に NF- κ B が関与していることが判明したが、その関与は部分的であり、他の転写因子も本誘導機構に関与している可能性が考えられる。そこで、Protein/DNA アレイ法 (345 種の転写因子の活性を同時に調べることができるメンブレンアレイ法) を用いてメチル水銀処理によって活性化される転写因子を網羅的に検索した。まず、雄の C57BL/6 マウスに 25 mg/kg のメチル水銀を 1 回投与し、このマウスの小脳中で活性化されている転写因子を Protein/DNA アレイ法によって検索した。なお、この小脳中での SCGB3A1 の発現レベルは約 40 倍上昇していることが確認されている。その結果、メチル水銀によって活性化される転写因子として、3 種の転写因子 (PAX4、PAX6 および TCF3) が同定された。そこで、3 つの転写因子をそれぞれ一つずつ siRNA を用いてノックダウンすることによって、メチル水銀による SCGB3A1 発現誘導への関与を調べた。その結果、3 つの転写因子の中で、TCF3 (Transcription factor 3) をノックダウンすることによってメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導が抑制されることが判明した。

(3)-5.NF- κ B および TCF3 の同時ノックダウンがメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に与える影響

メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導機構に NF- κ B および TCF3 が関与すること可能性が示された。そこで本誘導機構における両者の関係を明らかにするために、NF- κ B と TCF3 の同時ノックダウンがメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に与える影響を調べた。その結果、NF- κ B と TCF3 を同時ノックダウンしても相加的な抑制効果は認められなかった。したがって、NF- κ B と TCF3 は同一経路を介してメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に関与している可能性が考えられる。

(3)-6.TCF3 のノックダウンが C17.2 細胞のメチル水銀に対する感受性に与える影響

TCF3 とメチル水銀毒性との関係を明らかにするため、TCF3 siRNA を導入した細胞のメチル水銀感受性を調べたところ、TCF3 のノックダウンによって C17.2 細胞のメチル水銀感受性が亢進した。したがって、TCF3 はメチル水銀毒性に対して防御的な作用を有していると考えられる。

以上の結果から、TCF3 および NF- κ B を介した SCGB3A1 の発現誘導はメチル水銀毒性に対する生体防御システムとして重要な役

割を果たしていると考えられる。今後、本発現誘導機構の詳細を明らかにすることによって、メチル水銀が示す中枢神経選択的な毒性発現機構の解明に繋がることが期待される。

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 2 件)

1. Takahashi T., Iwai-Shimada M., Syakushi Y., Kim M.S., Hwang G.W., Miura N., Naganuma A., Methylmercury induces expression of interleukin-1 β and interleukin-19 in mice brains. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2, 239-243 (2015) 査読有.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fts/2/6/2_239/_pdf
2. Kim M.S., Takahashi T., Lee J.Y., Miura N., Asanuma M., Hwang G.W., Naganuma A., Identification of transcription factors activated by methylmercury in mouse brain. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 4, 37-39 (2017) 査読有.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fts/4/1/4_37/_pdf

[学会発表] (計 7 件)

1. 岩井美幸, 釋氏佑紀奈, 金ミンソク, 黄基旭, 高橋 勉, 永沼章, メチル水銀によってマウス脳組織中で発現誘導されるサイトカイン. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 2014 年 7 月 4 日, 神戸コンベンションセンター (神戸市)
2. 金ミンソク, 高橋 勉, 黄基旭, 永沼章, メチル水銀によるマウス脳組織中でのケモカイン CCL4 発現誘導における転写因子 SRF および FOXA1 の関与. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 2014 年 7 月 4 日, 神戸コンベンションセンター (神戸市)
3. 松田健人, 高橋 勉, 黄基旭, 永沼章, メチル水銀によるオートファジー誘導における LAMTOR 複合体の関与. 日本薬学会フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 20 日, つくば国際会議場 (つくば市)
4. 高橋 勉, 金ミンソク, 黄基旭, 永沼章, メチル水銀による転写因子 SRF を介したケモカイン CCL4 発現誘導機構. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸学院大学 (神戸市)
5. 高橋 勉, 金ミンソク, 齋藤隆寛, 趙 倩, 岩井美幸, 黄基旭, 永沼章, メチル水銀によってマウス脳特異的に発現誘導されるセクレトグロビン 3A1. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015 年 6 月 29 日, 石川県立音楽堂 (金沢市)
6. 高橋 勉, 金ミンソク, 李 辰竜, 黄基

旭, 永沼 章, メチル水銀による脳特異的なケモカイン誘導とその機構解析. メタルバイオサイエンス研究会 2015, 2015年8月28日, 名古屋国際センター (名古屋市)

7. 高橋 勉, 趙 倩, 金ミンソク, 岩井美幸, 黄 基旭, 永沼 章, メチル水銀による SCGB3A1 発現誘導における NF-κB の関与. 日本薬学会フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2015年9月1日, 2015年9月18日, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス (神戸市)

[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

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/~yasuyuki/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 勉 (TAKAHASHI, Tsutomu)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 00400474

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()