

日本化学工業協会
日本毒性学会第5回LRI賞受賞講演

**化学物質神経毒性の分子基盤解明と
毒性評価指標の開発**

2019. 8. 30 (Fri.)

広島大学大学院医系科学研究科
古武 弥一郎

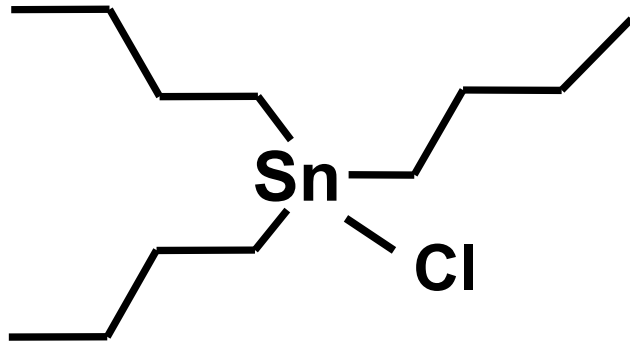
Outline

1. 有機スズによるGluR2/GluA2減少を介した神経脆弱化
2. GluR2/GluA2減少を指標にした神経毒性評価

Outline

1. 有機スズによるGluR2/GluA2減少を介した神経脆弱化
2. GluR2/GluA2減少を指標にした神経毒性評価

トリブチルスズ (TBT)



tributyltin chloride
(TBT chloride)

- ・ 船底や魚網の防汚剤として広く使用されてきた環境汚染化学物質
- ・ 海洋中の無脊椎動物の雄化現象（内分泌かく乱作用）
- ・ 特定化学物質
- ・ 内分泌攪乱作用に加えてさまざまな毒性がある
- ・ 脂溶性が高く、脳移行する
- ・ 有機スズ化合物は野生生物脳中やヒト血液中から数nMで検出される
- ・ 生体内濃度と毒性発現濃度が非常に近い

TBTに関して我々が明らかにしたこと

500 nM TBTによりグルタミン酸放出が促進され、過剰なグルタミン酸受容体の活性化を介して神経細胞死が惹起される

Toxicol. Sci. (2006)

TBTによるグルタミン酸放出メカニズムにAMP-activated protein kinase (AMPK) が関与している

Toxicol. Appl. Pharmacol. (2008)

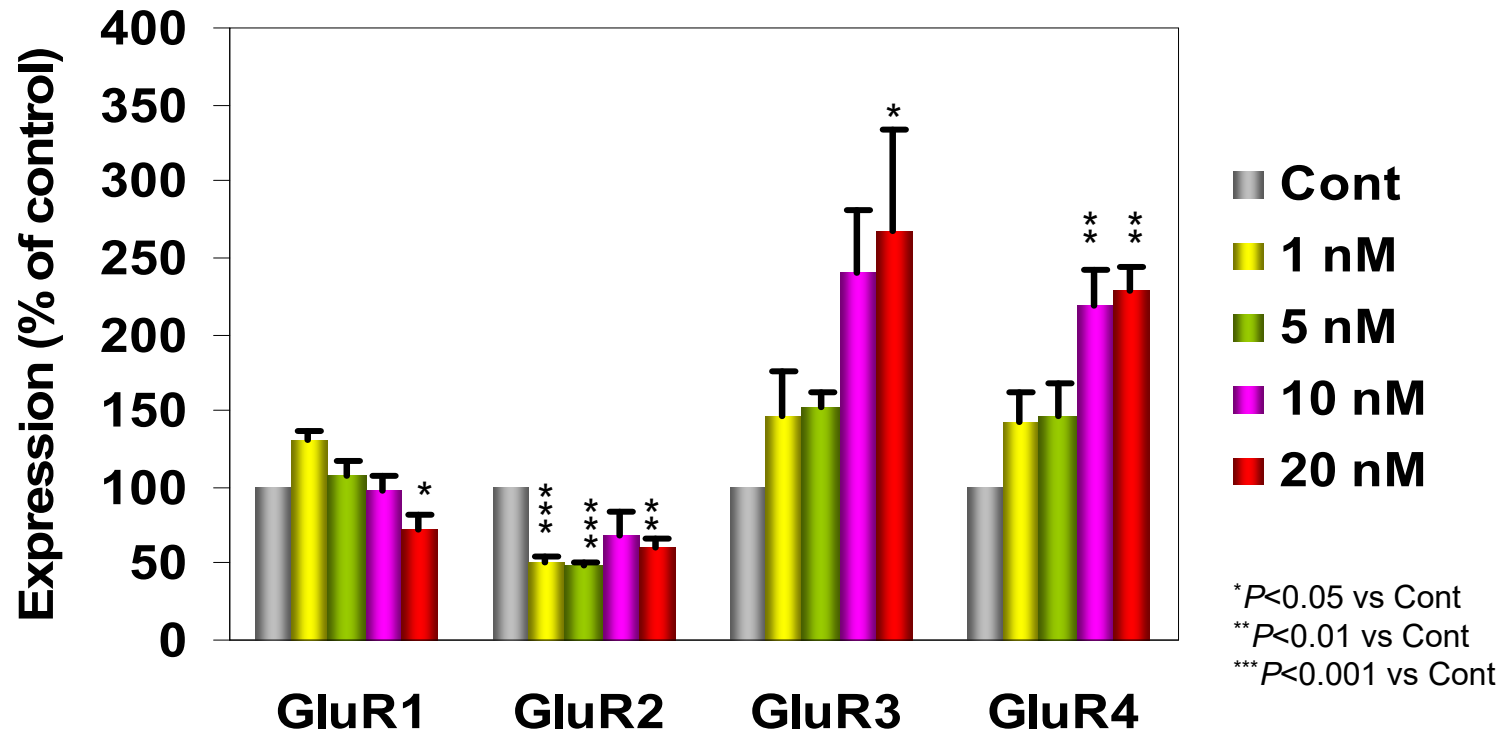
TBTの濃度により細胞死メカニズムが異なる

Toxicol. Sci. (2007)

低 濃 度

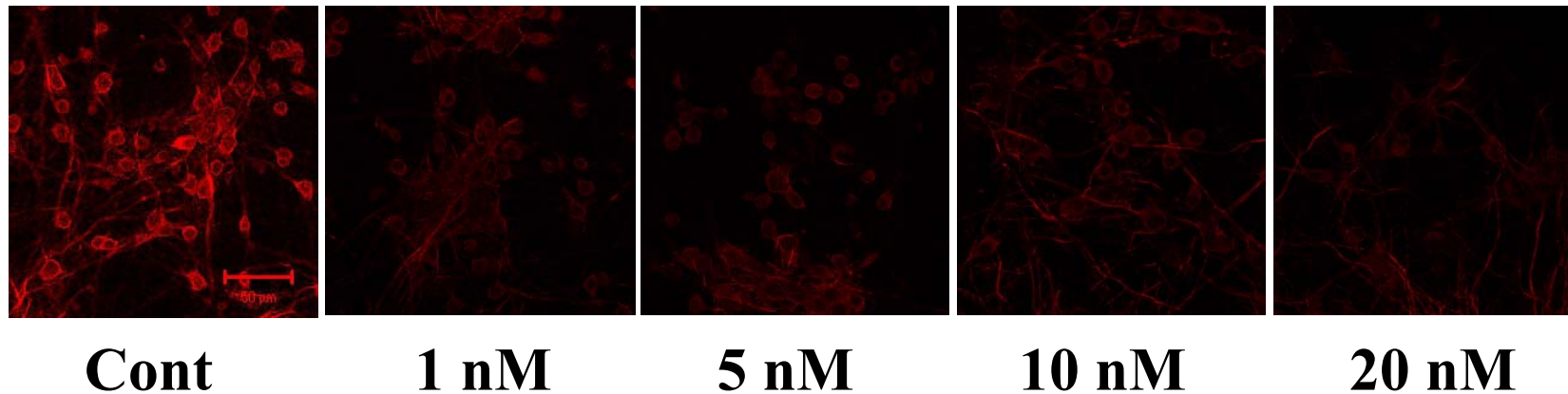
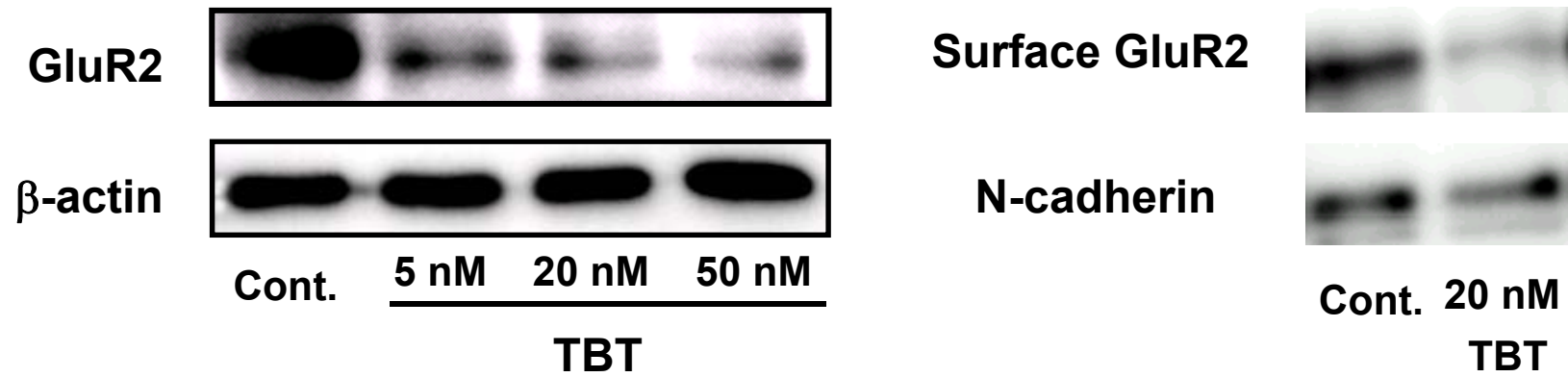
でのみ起こる「毒性につながる現象」

Change of mRNA expression of AMPA receptor subunits

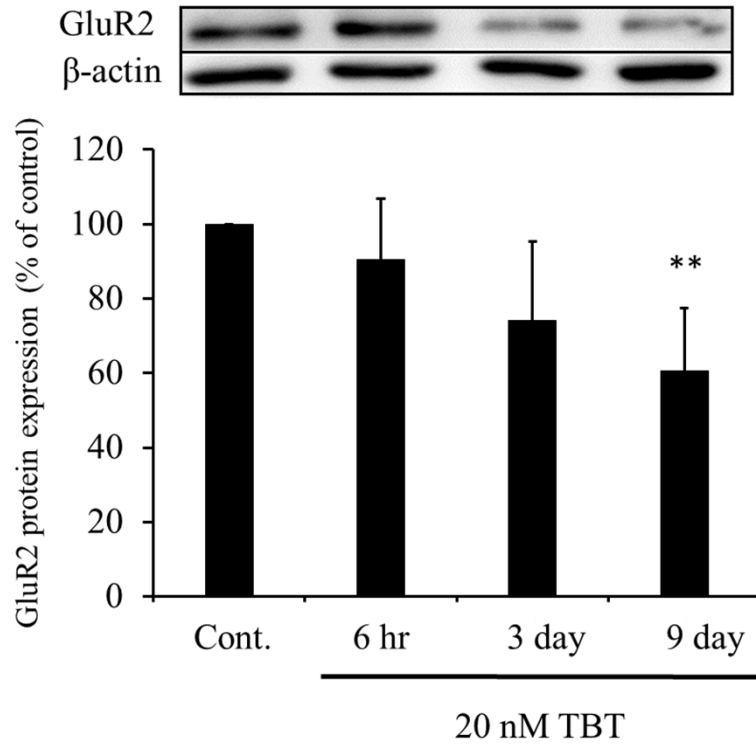


Nakatsu, Kotake *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **240**, 292-298 (2009).

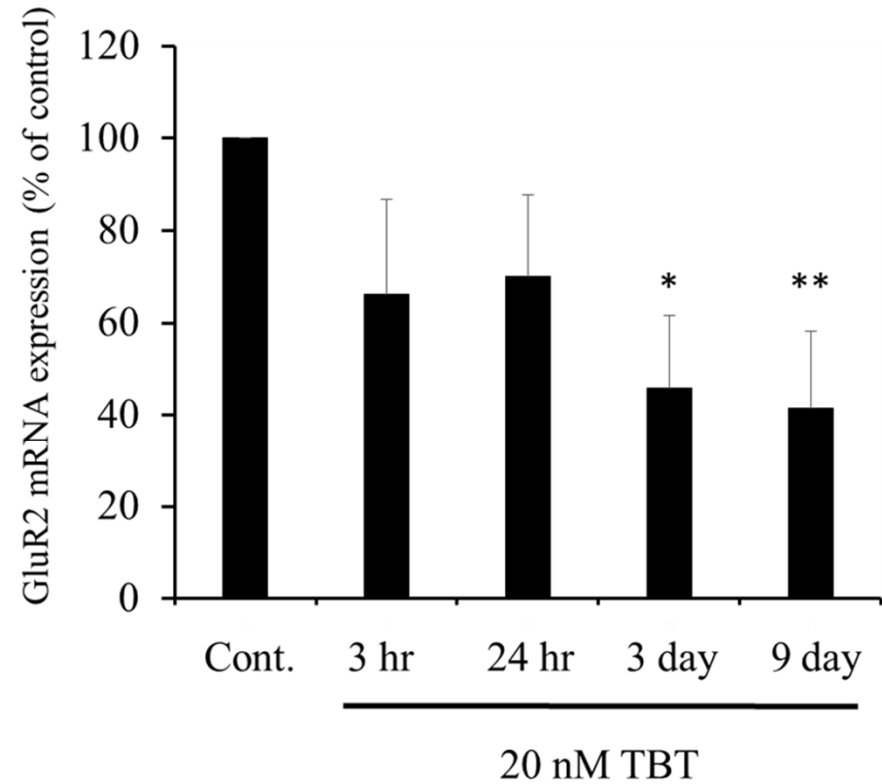
Decrease of GluR2/GluA2 protein caused by chronic exposure of TBT



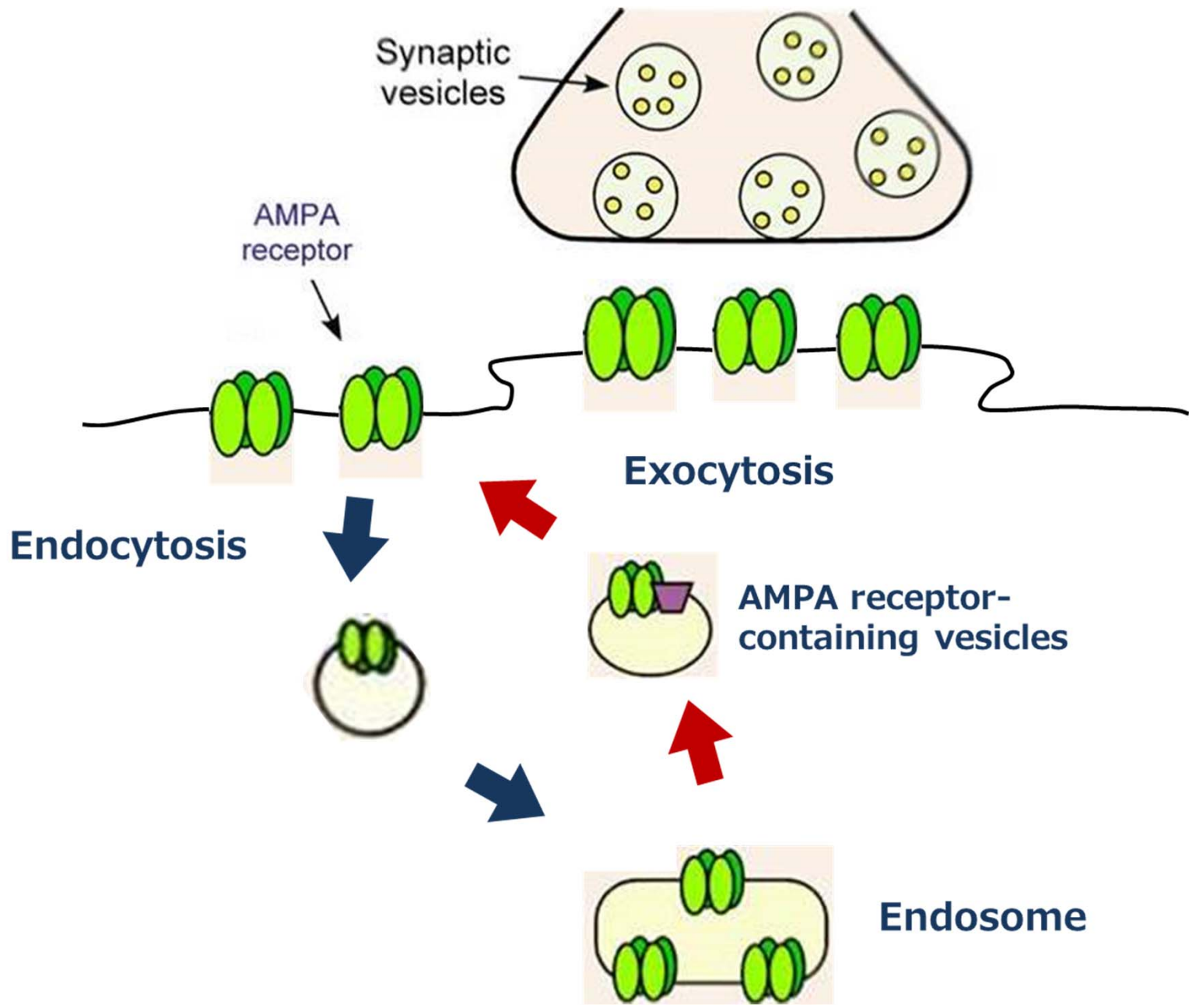
Time course of GluR2 mRNA and protein



Data are expressed as mean + S.D. (n=5) ** P <0.01 vs Cont.



Data are expressed as mean + S.D. (n=3) * P <0.05, ** P <0.01 vs Cont.



Ca²⁺ permeability of AMPA receptors

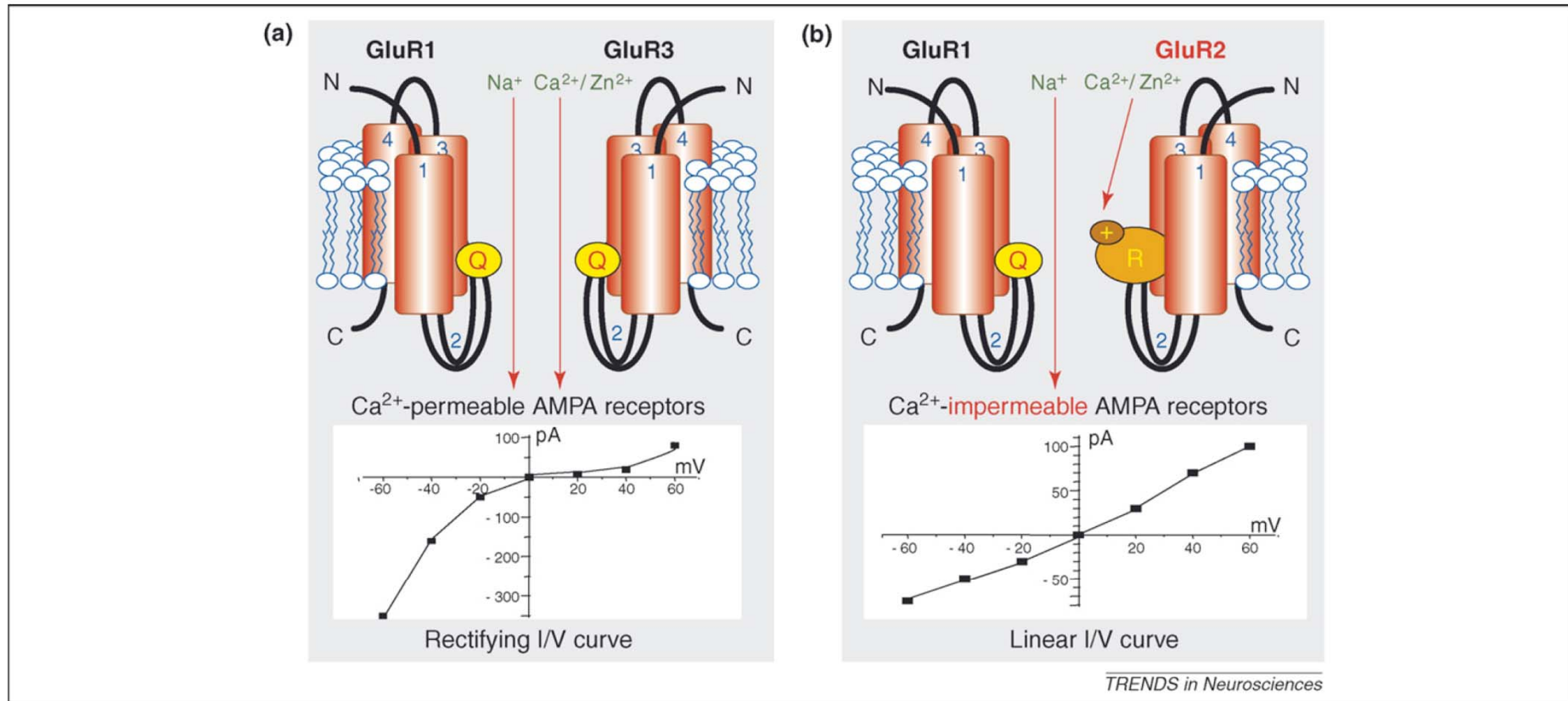
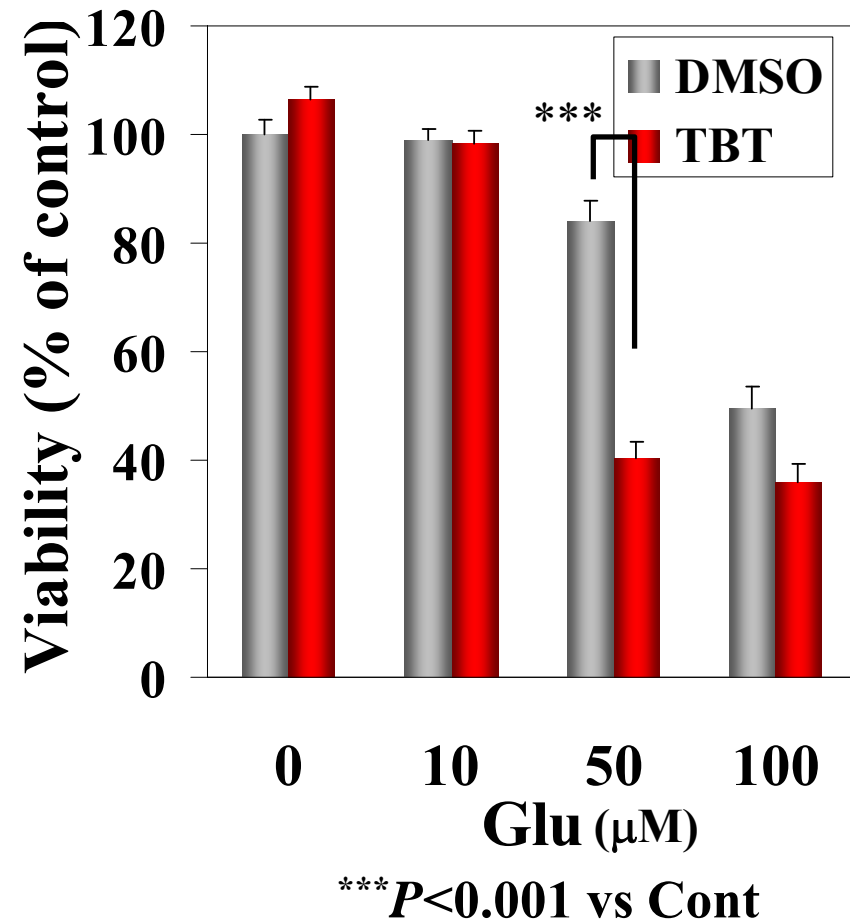
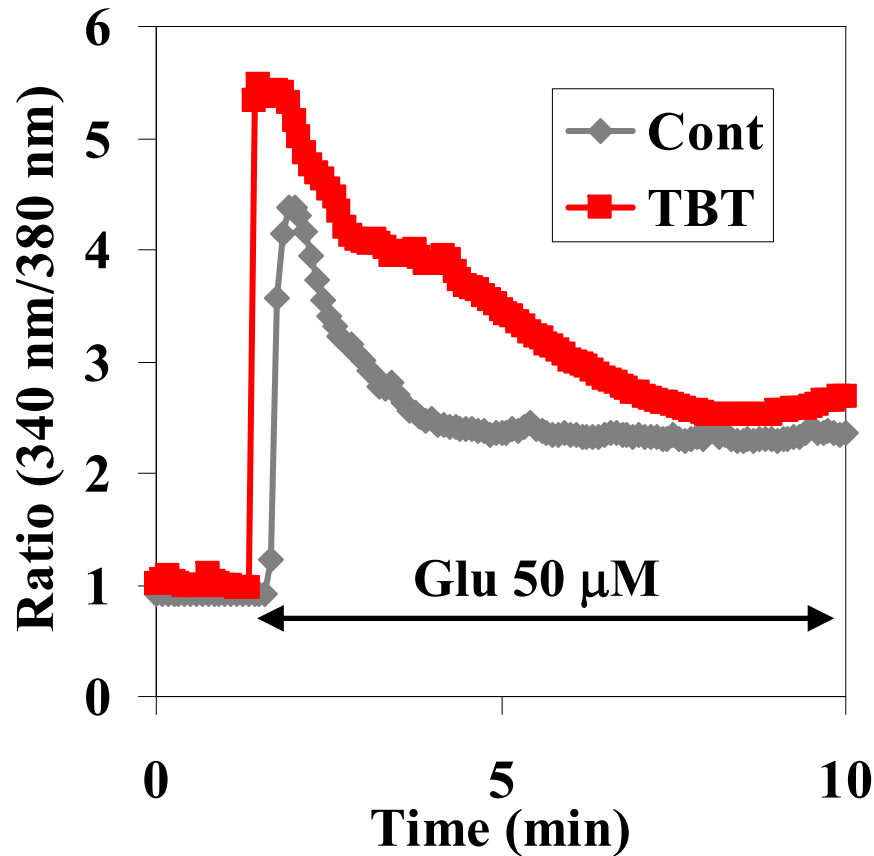
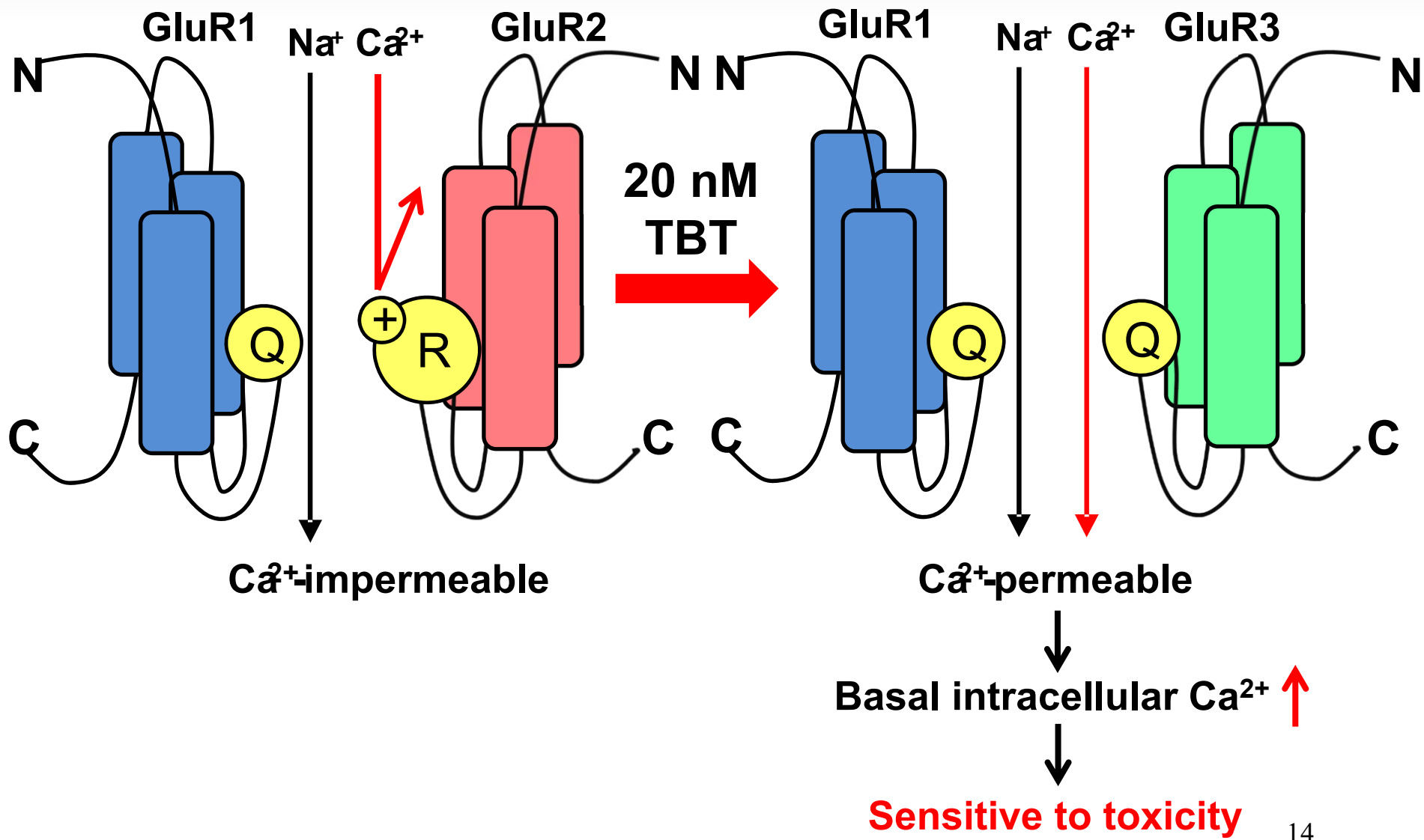


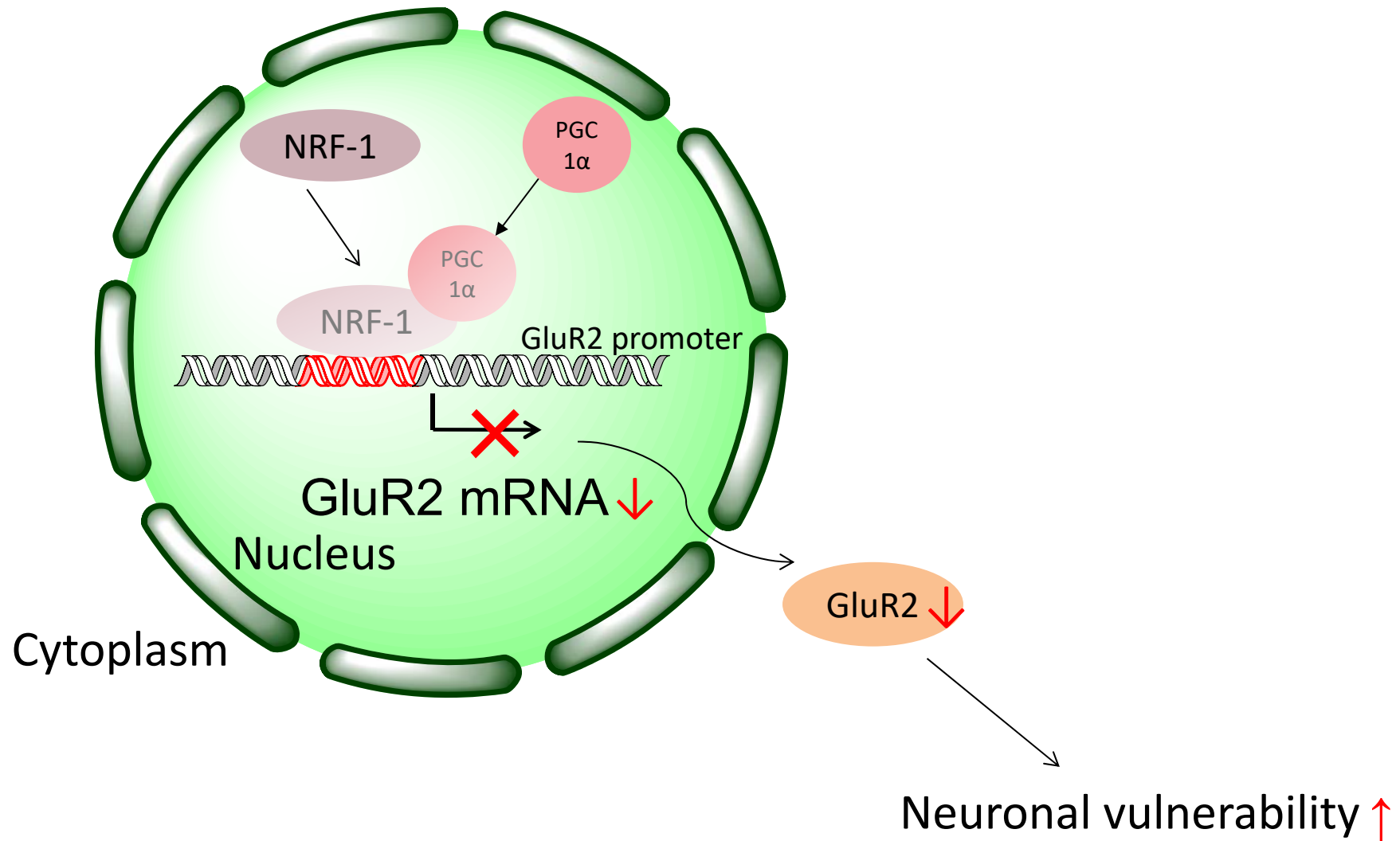
Figure 1. Ca²⁺ permeability of AMPA receptors depends on the subunit composition. (a) GluR2-lacking AMPA receptors are highly permeable to Ca²⁺ and exhibit doubly rectifying I-V relationships. Rectification of GluR2-lacking AMPA receptors arises as a consequence of use- and voltage-dependent channel blockade by endogenous intracellular polyamines. (b) GluR2-containing AMPA receptors are impermeable to Ca²⁺ and exhibit electrically linear I-V relationships. The presence of the GluR2 in heteromeric AMPA receptor channels limits Ca²⁺ and Zn²⁺ influx and markedly reduces single-channel conductance [10], owing largely to the presence of a positively charged R instead of a Q residue at the Q/R RNA editing site. Assuming the channel number is unaltered, current amplitudes will be smaller for GluR2-containing AMPA receptors (b). Reproduced, with permission, from Ref. [69]. I-V relationships reproduced, with permission, from Ref. [4,15-17].

Effects of chronic exposure of TBT on intracellular Ca^{2+} increase and cell death caused by glutamate





TBTによるGluR2発現減少は 核呼吸因子-1 (NRF-1) 活性低下による



Outline

1. 有機スズによるGluR2/GluA2減少を介した神経脆弱化
2. GluR2/GluA2減少を指標にした神経毒性評価

従来の神経毒性試験

一般毒性試験において神経毒性が疑われる物質について

運動機能試験

記憶・学習試験

組織学的形態異常を調べる試験 が中心

大量の実験動物と莫大なコスト、時間、労力が必要

重篤な毒性がないと検出されない



神経毒性を検出できる優れた指標を見出せば
初期スクリーニングに利用できるのではないか？

In vitro神経毒性評価指標

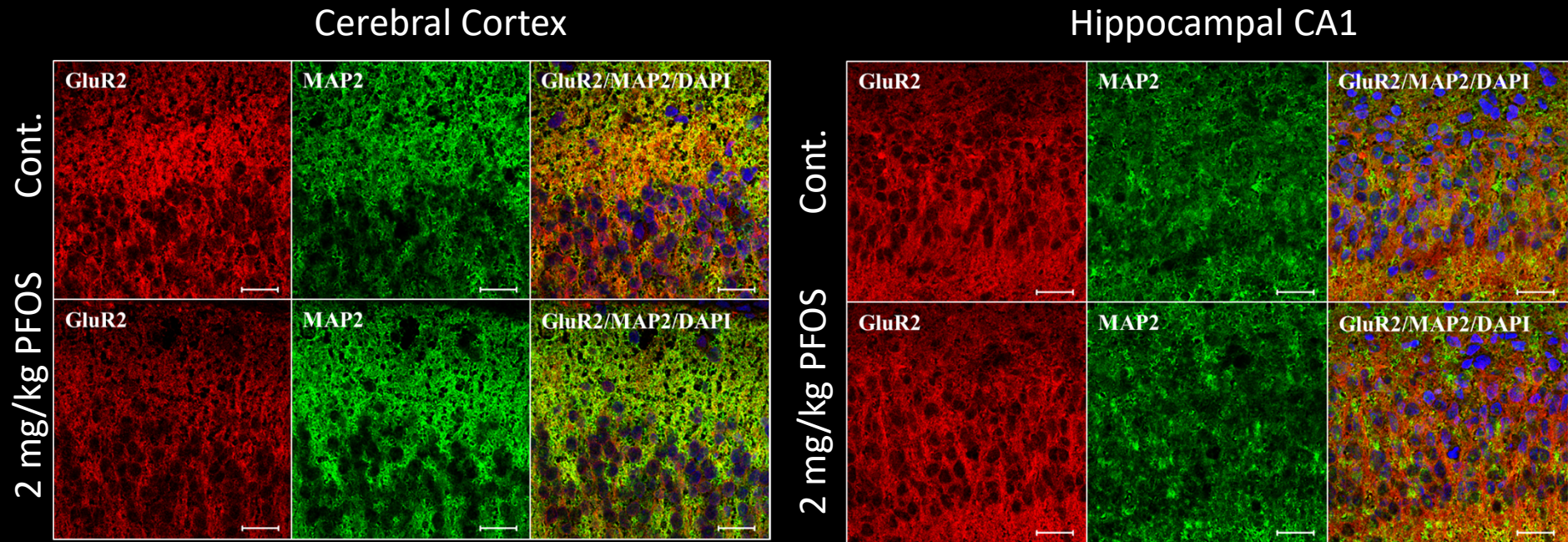
これからは、in vitroあるいはin silicoの毒性評価系が重要になってくる
(National Research Council of the USA, Toxicity testing in the 21st century:
a vision and strategy)

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) などの栄養因子
ニューロペプチド
細胞外マトリックスタンパク質
各種miRNA など

これまでに知られている毒性評価指標については、毒性が発現してはじめて変化するものが多く、早期に変動する高感度評価指標が望まれている

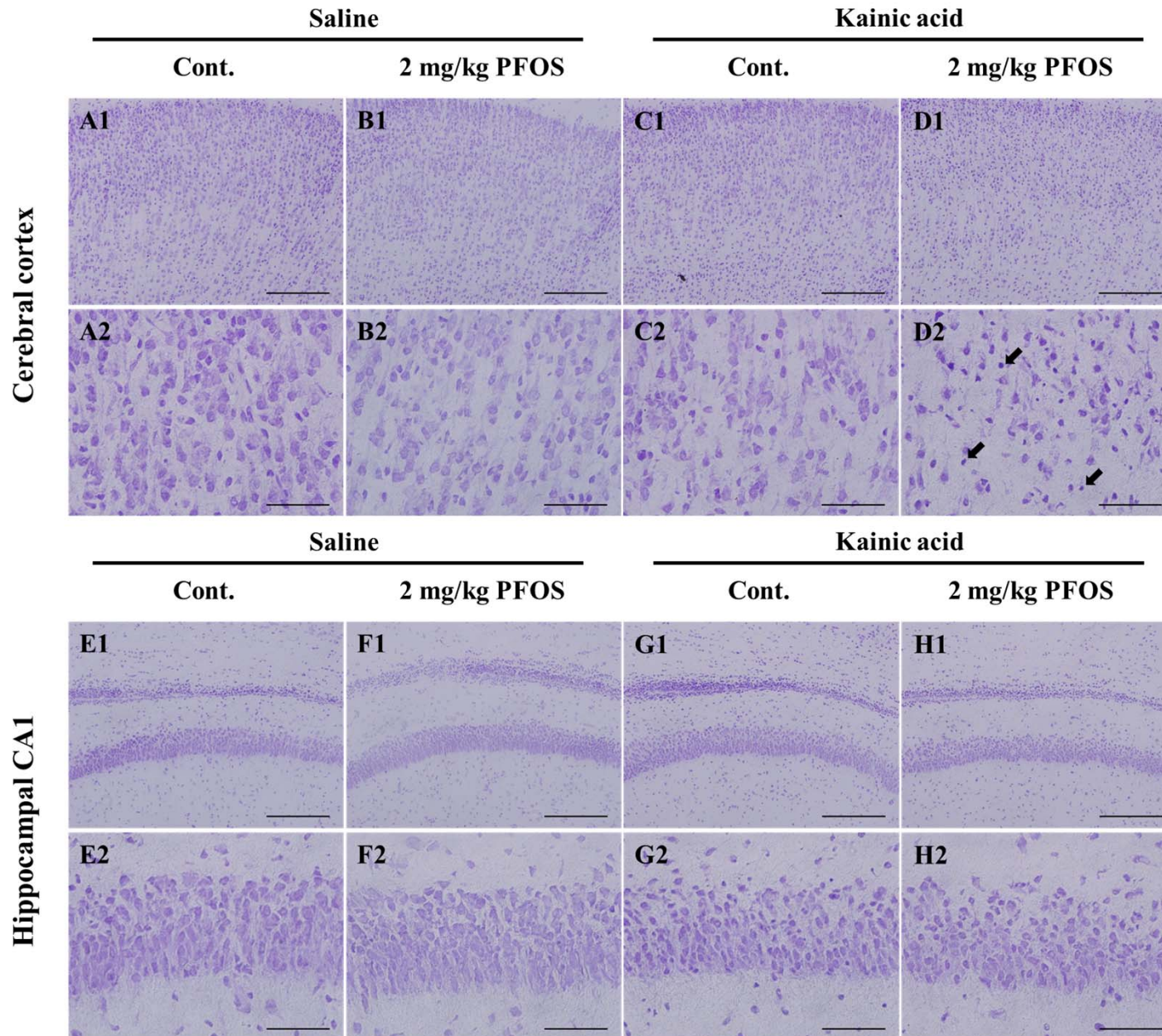
(Costa and Pellacani, Central nervous system toxicity biomarkers.
Biomarkers in Toxicology (2014))

PFOS 投与ラットにおける神経特異的 GluR2 発現減少



MAP2: Microtubule Associated Protein 神経細胞マーカー

PFOS 投与ラットにおける神経脆弱性評価



Ishida *et al.*, *Arch. Toxicol.* **91**, 885-895 (2017).

GluR2 サブユニットを欠損させると

In vivo

GluR2 ノックアウトマウス

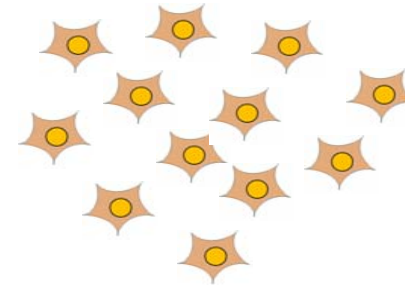


行動異常・記憶障害を示す

Mead *et al.*, *Behav. Neurosci.*, **120**, 241-248, (2006).

In vitro

GluR2 ノックアウト神経細胞

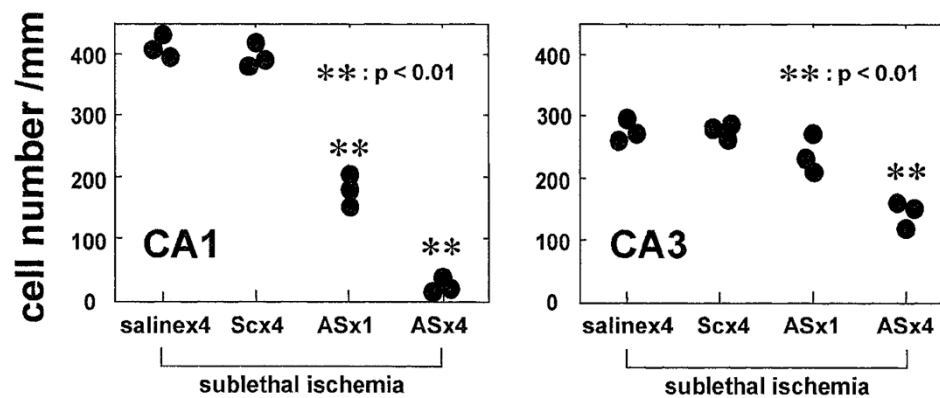
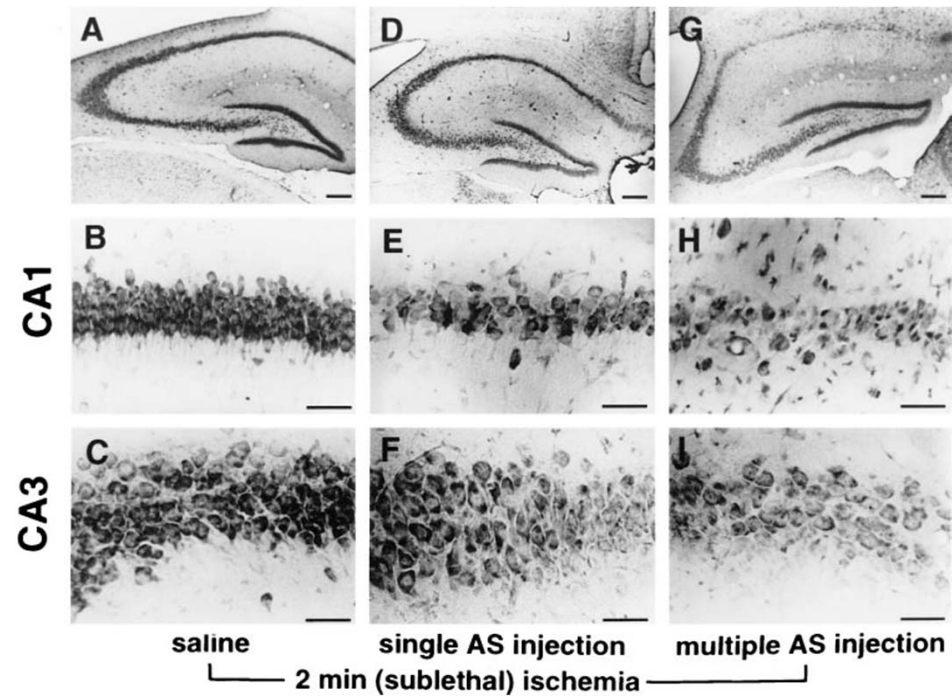


弱いアゴニスト刺激で
細胞死が起きる

Iihara *et al.*, *J. Neurosci.*, **21**, 2224-2239 (2001).

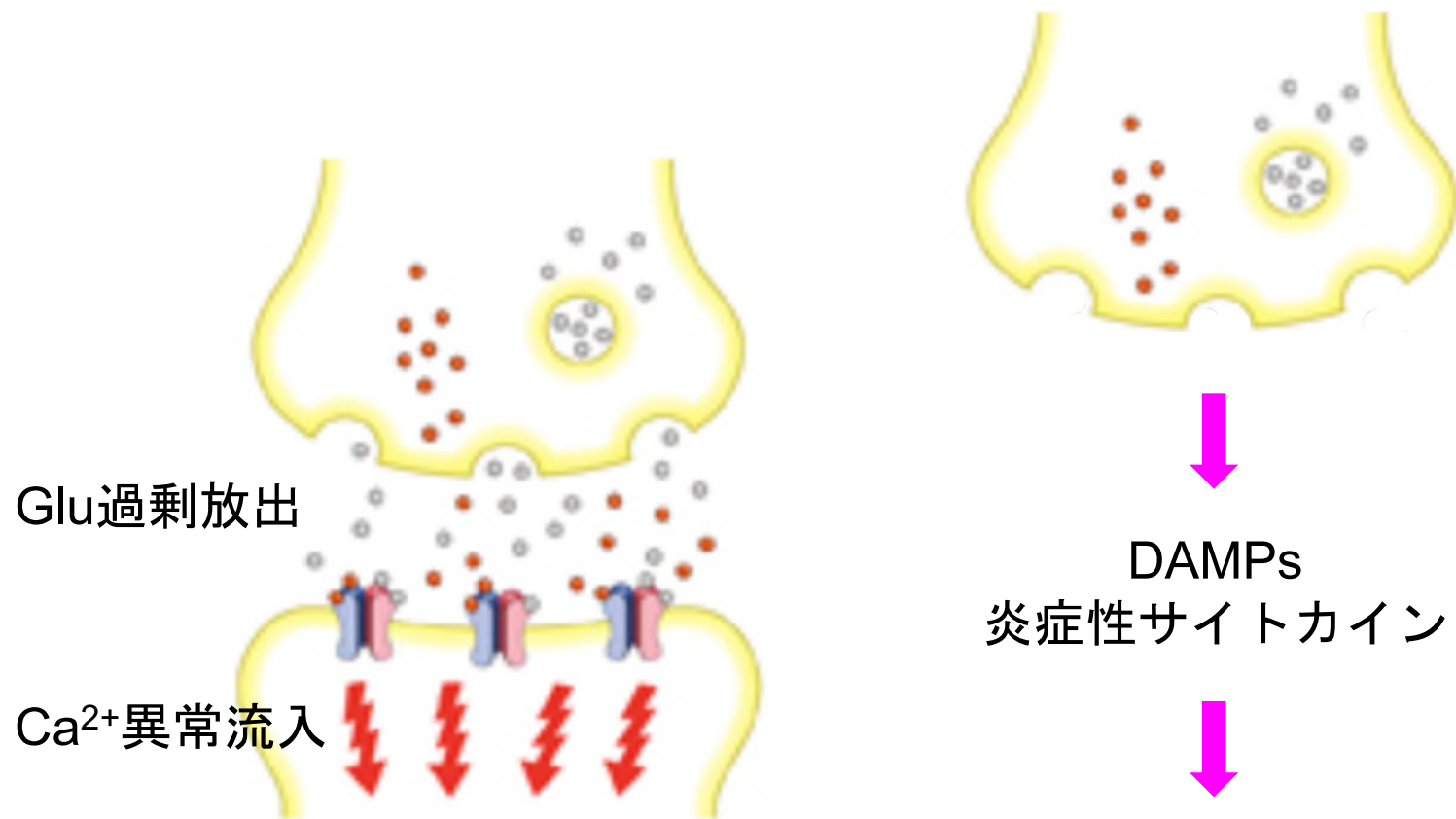
GluR2 発現減少は神経細胞にダメージを与える

Synergistic action of GluR2 antisense and sublethal global ischemia



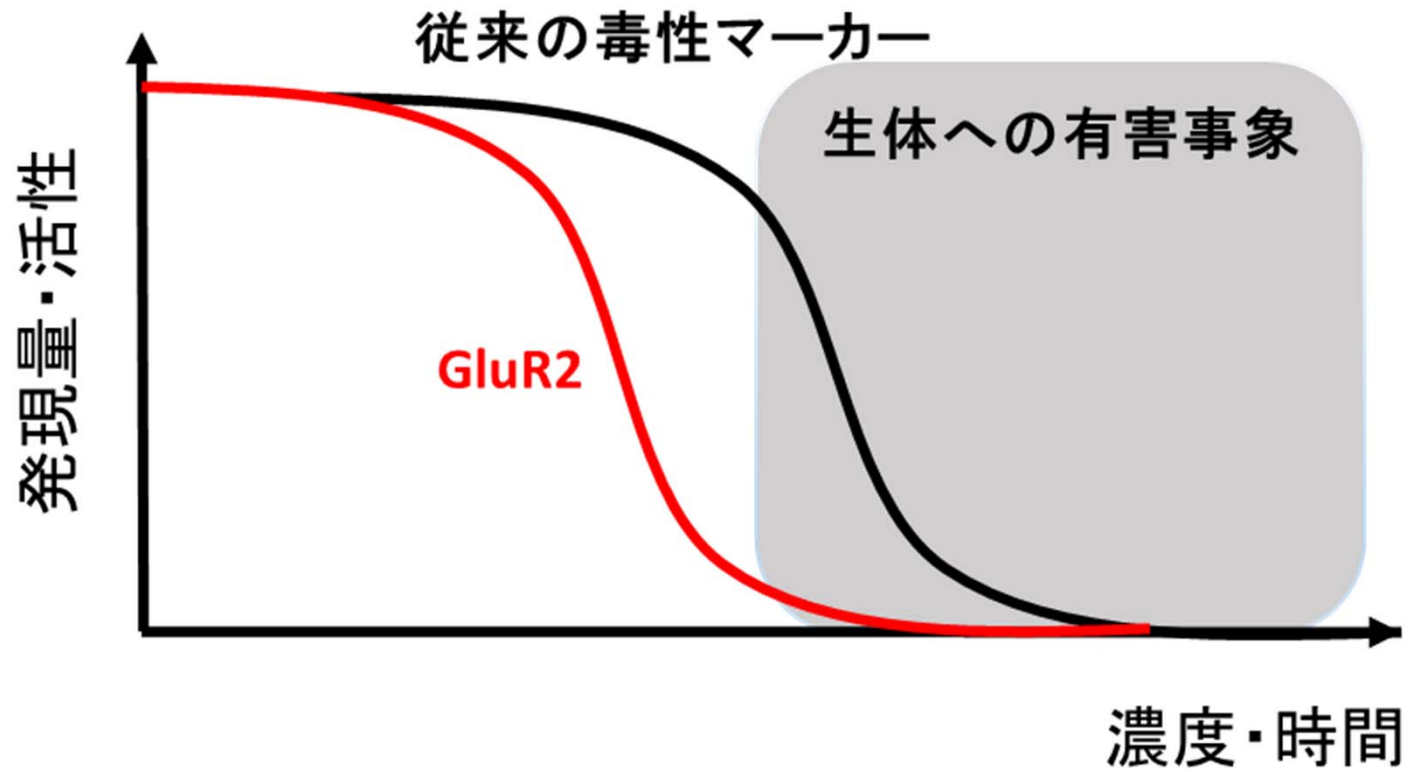
Oguro *et al.*, *J. Neurosci.* **19**, 9218-9227 (1999).

既知神経細胞ダメージの主なメカニズム

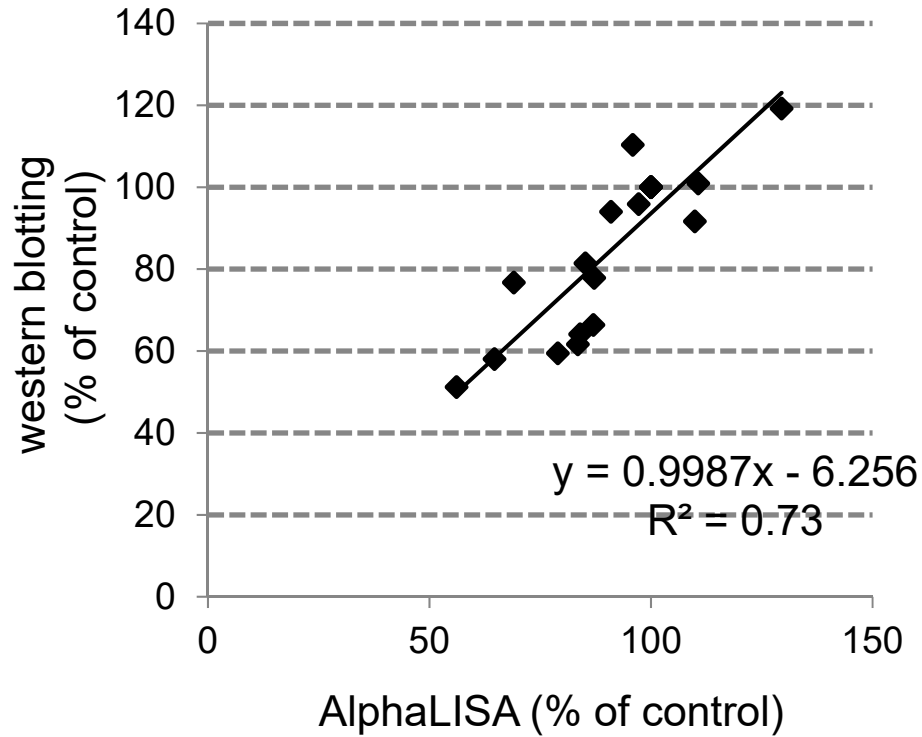


神経細胞死あるいは重篤なダメージ

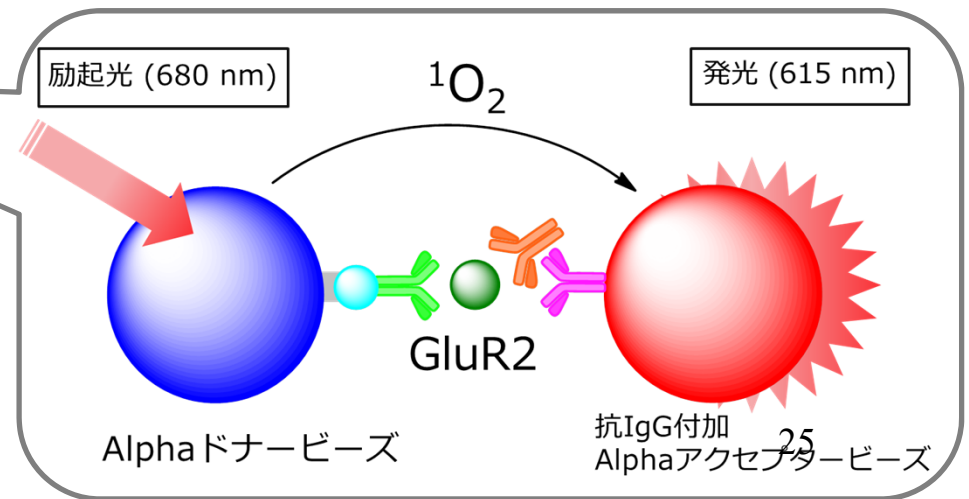
毒性指標の概念図



GluR2発現簡便評価系の構築



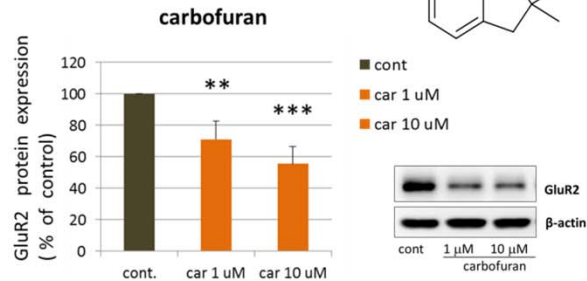
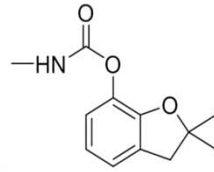
Sugiyama, Kotake et al.
Toxicol. Rep. **2**, 450-460 (2015).



Western blottingによるGluR2減少化学物質の評価

carbofuran

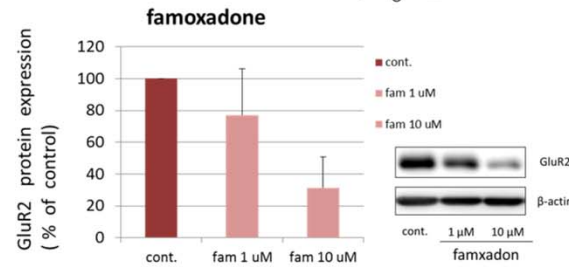
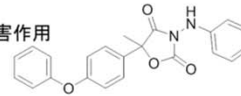
カルバメート系殺虫剤
神経シナプスにおける
アセチルコリンエステラーゼ阻害



Data are expressed as the mean + S.D
for 3 rats per group

famoxadone

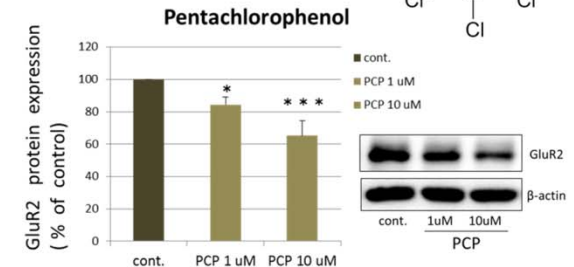
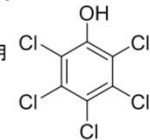
殺菌剤
ミトコンドリアの電子伝達系複合体阻害作用
オキサゾリジンジオン構造を有する



Data are expressed as the mean + S.D
for 2-3 rats per group

Pentachlorophenol(PCP)

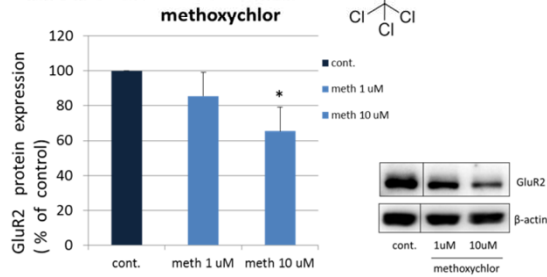
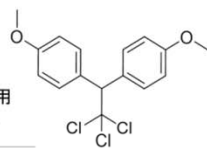
殺菌剤
ミトコンドリアの酸化的リン酸化共役阻害作用



Data are expressed as the mean + S.D
for 3 rats per group

methoxychlor

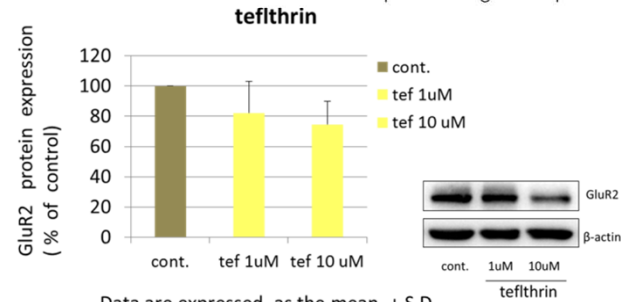
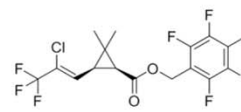
有機塩素系殺虫剤
寄生虫駆除剤
神経軸索ナトリウムチャンネルに作用



Data are expressed as the mean + S.D
for 3 rats per group

teflthrin

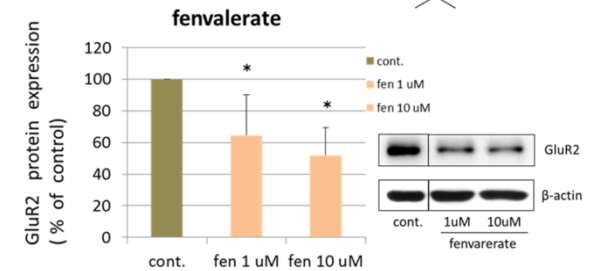
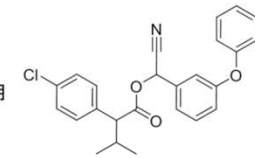
合成ピレスロイド系殺虫剤
神経軸索ナトリウムチャンネルに作用



Data are expressed as the mean + S.D
for 4 rats per group.

fenvalerate

合成ピレスロイド系殺虫剤
神経軸索ナトリウムチャンネルに作用

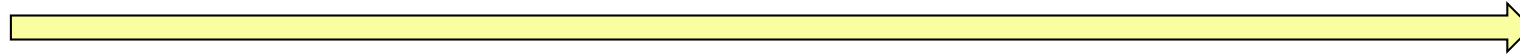


Data are expressed as the mean + S.D
for 4 rats per group

まとめ

上流

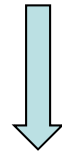
下流



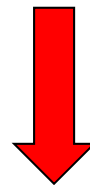
GluR2発現減少を
惹起する原因の解明
核呼吸因子-1 or ?



持続的GluR2発現
減少が及ぼすin vivo
神経毒性評価



GluR2発現減少を惹起する
他の化学物質の探索



化学物質の新規高感度神経毒性評価系の構築

謝 辞

広島大学薬学部生体機能分子動態学研究室

太田 茂

佐能 正剛

中津 祐介

瀧下 智子

青木 香織

宮良 政嗣

津山 由美

石田 慶士

杉山 千尋

梅田 香苗

徳永 航

桑原 由佳

齋木 崇史

渡辺 南海子

摂南大学理工学部

木村 朋紀

国立衛研薬理部

諫田 泰成

広島大学薬学部生体機能分子動態学研究室



生体機能分子動態学

