

中枢神経系におけるトリメチルスズの作用

新谷紀人,^{*,a} 荻田喜代一,^b 橋本 均,^{a,c} 馬場明道^a

Recent Studies on the Trimethyltin Actions in Central Nervous Systems

Norihito SHINTANI,^{*,a} Kiyokazu OGITA,^b Hitoshi HASHIMOTO,^{a,c} and Akemichi BABA^a

^aLaboratory of Molecular Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan, ^bLaboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata City 573-0101, Japan, and ^cCenter for Child Mental Development, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan

(Received November 6, 2006)

Trimethyltin (TMT) is a toxic organotin compound that produces injury to the central nervous systems of mammals. Recently, high-dose TMT (2.8 mg/kg) has been shown to produce neurodegeneration and subsequent neurogenesis specifically in the hippocampal dentate gyrus of mice, indicating that mice injected with TMT serve as a useful *in vivo* model to study neurogenesis as well as neurodegeneration in this brain region. In addition, gene-engineered mice have allowed research to focus on the mechanisms of TMT toxicity. These studies have revealed the involvement of stannin, nuclear factor kappa B (NF- κ B), presenilin-1, apolipoprotein E, and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) in TMT toxicity and suggested the relationship between genetic mutations and neuronal susceptibility to degeneration. In this review, we briefly summarize the previous studies and discuss the current status of research on TMT.

Key words—trimethyltin; corticosterone; neurodegeneration; neurogenesis; knockout mice

1. はじめに

スズ (tin) は比較的安全な金属として青銅器時代より用いられ、現在でもメッキやハンダとして汎用される。しかし有機スズの種類であるトリメチルスズ (TMT) は、高用量の暴露により中枢辺縁領域の神経機能障害を惹起することが、げっ歯類^{1–12)}だけでなくヒト^{13–15)}でも広く知られており、またそれに関連する行動異常や、末梢機能異常、近年では、神経幹細胞に対する作用など、多彩な中枢作用が見出されている。⁴⁾ 有機スズでは、雌の貝 (イボニシ) を雄性化させるトリブチルスズ (TBT)¹⁶⁾を始め、スズに結合する有機基の種類や数によって異なる、種々の特異的な作用が知られている。^{1–3)} 例

えば、トリエチルスズ (TET) はげっ歯類でミエリン脱落を伴う活動量減少や筋力低下、脳浮腫を引き起こし、TBTは免疫系の機能異常を引き起こす。²⁾ しかし、いずれもTMTのような中枢辺縁領域の神経傷害は惹起せず、それぞれのジアルキル体、モノアルキル体も重篤な毒性は発揮しない。^{2,3,6)} これら組織特異的な毒性のメカニズムは、TBTで著しく活性化される retinoid X receptor (RXR)¹⁷⁾ や histone acetyltransferase¹⁸⁾ に関する研究から分子レベルでの考察がなされている一方、近年では、TMTで障害を受ける組織に特異的に発現する分子 stannin¹⁹⁾ に関する研究や、各種遺伝子改変動物を用いた研究からも、その特異的作用メカニズムの考察がなされている。そこで本総説では、中枢神経系におけるTMTの作用を解析した研究のうち、特にマウスにおける脳海馬の神経傷害及び神経新生に関する研究、そして遺伝子改変マウスを用いたTMTの毒性研究をまとめ、筆者らの研究結果も併せて概説する。

^a大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6), ^b摂南大学薬学部薬理学教室 (〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1), ^c大阪大学大学院医学系研究科附属子どものこころの発達研究センター (〒565-0871 吹田市山田丘 2-2)

e-mail: shintani@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

2. トリメチルスズの中樞神経系に対する作用

研究や産業機関での事故によって高濃度の TMT に暴露されたヒトの症例報告では、種々の内蔵器官の強烈的な痛みに加え、頭痛や不眠、食欲減退、記憶障害や過活動（多動性）、集中力の消失などの中枢機能障害が認められ、^{4,13-15} 脳でも神経変性が観察される。¹⁵ 一方げっ歯類においても、高用量 TMT の腹腔内投与は、副腎や腎臓、肝臓、免疫担当器官の傷害や、聴覚などの感覚器官の傷害に加え、特に脳の辺縁領域（海馬、梨状皮質、嗅皮質、嗅結節、扁桃体など）に重篤な傷害を及ぼす。^{1-8,10,11} また TMT を投与されたげっ歯類は、これらの神経傷害に関連するとされる、多動や痙攣、攻撃性の亢進などの行動異常や、^{3,7,12} 食欲低下に伴う体重減少、^{7,12} そして記憶障害^{9,10} などの特異な表現型変化が観察され（Table 1）、その一部はヒトの症例報告と類似したものと言える。本節では、主にげっ歯類の研究から明らかにされた、中枢神経系におけるトリメチルスズ毒性の特性をまとめる。

2-1. 海馬におけるトリメチルスズの細胞種特異的な毒性 脳部位の1つである海馬は記憶形成の座として知られ、本部位の神経細胞死は、アルツハイマー病や脳血管性痴呆、脳虚血後の記憶障害の直接的原因と考えられている。冒頭で述べた通り、TMT に暴露された動物・ヒトにおいても、海馬の神経傷害及び記憶障害が認められるが、その神経細胞傷害のパターンは、他の記憶障害を示す病態やモデル動物のそれと異なっており興味深い。Figure 1 に示すように、海馬はアンモン角（Ammon's hone, CA1-3）、歯状回（dentate gyrus, DG）などから構

成され、アンモン角を構成する神経細胞を錐体細胞、歯状回を構成する神経細胞を顆粒細胞と呼ぶ。また一般に、嗅内皮質（entorhinal cortex）から入力された情報は、貫通繊維によって DG 領域へ、苔状繊維によって DG から CA3 へ、Schaffer 側枝によって CA3 から CA1 領域へ伝達され、その後、海馬外へ出力される。⁴ 全脳・部分的脳虚血や低酸素暴露等のヒト病態や、脳虚血の動物モデル（グルタミン酸アゴニストのカイニン酸等の腹腔内投与動物）では、いずれもアンモン角の CA1 錐体細胞が選択的に傷害される。^{4,20,21} しかし高用量の TMT 投与は、ラットでは CA 及び DG 領域（特に CA3 領域）の神経細胞を傷害するのに対し、⁵⁻⁸ マウスでは DG 顆粒細胞を特異的に傷害する。^{11,22-26} 例えば TMT (2.8 mg/kg) を成体のマウスに腹腔内投与すると、DG 領域において投与 1 日後から顆粒神経細胞の脱落、及び DNA の断片化（抗 single-stranded DNA (ssDNA) 抗体陽性細胞の増加）が観察され、神経細胞脱落は 2-3 日で最大となる（Fig. 2）。し

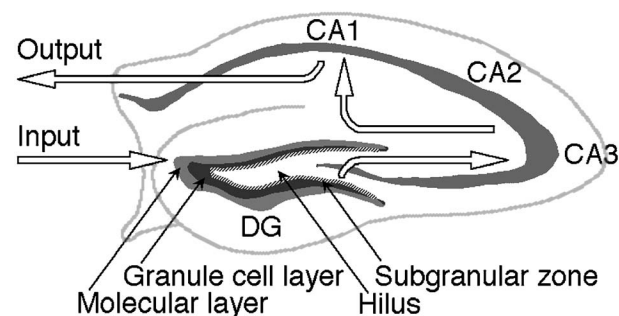


Fig. 1. Distinct Structure and Primary Information Transmission in Rodent's Hippocampus

Table 1. Phenotypic Changes in Mice Injected with High-dose TMT

Parameter	Phenotypic changes	Period (days) ^{a)}
General behavior	Hyperactivity, convulsion and aggressiveness	1~3
Appetite	Decrease in food and water intakes	~2
Body weight	Decrease (recovered ~7 days)	~2
Object memory	Decrease (recovered at 14 days)	4 ^{b)}
Histology in the CA1	No significant changes	~30
Histology in the DG	Severe neurodegeneration	~3 (~54)
	Decrease in molecular markers of neurons	~3 (~54)
	Increase in granule cells	4~7
	Increase in genes related to neurogenesis	4~5
Plasma corticosterone	Increase	1~3 ^{b)}

a) Period when phenotypic changes were observed. b) Time course analysis was not performed.

かしこのようなアポトーシスを含む神経細胞死は、CA 領域では少なくとも投与 30 日後まで全く認められない。²⁶⁾

脳虚血モデルでは、海馬の領域特異的な神経細胞傷害の原因が、グルタミン酸受容体の発現変化や、神経終末における Zn の含量の違い、領域別のグリア細胞脆弱性の違いから考察されている。^{4,21)} 一方で荻田らは、TMT によるマウス DG 特異的細胞死のメカニズムについて、その一端を activator protein-1 (AP-1) に着目した解析から明らかにした。²⁵⁾ AP-1 は、Fos ファミリー、Jun ファミリー及び ATF ファミリーからなる 2 量体により構成され、DNA 上の AP-1 結合部位に結合して転写制御を行い、細胞の分化・増殖・アポトーシスなどを調節するとされる転写因子複合体である。TMT 投与後に AP-1 の DNA 結合能を解析したところ、結合の増強が脳内では海馬で顕著であること、その増強は TMT 投与 1 日から 3 日後に観察されることが見出された。また TMT による AP-1 構成蛋白質の発現変動を解析したところ、海馬では Fra-2 及び c-Jun の増加が顕著であった。そこでこれら分子とリン酸化 ATF-2 の発現変化を組織化学的に解析したところ、リン酸化 c-Jun は TMT 投与後 6 時間から DG 顆粒細胞層に発現し、16 時間後には CA1-3 錐体細胞層でも誘導されたのに対し、Fra-2 は投与後 16 時間で CA1 錐体細胞層のみに、リン酸化 ATF-2 は投与後 6 時間で CA1-3 錐体細胞層に強く発現した。c-Jun の活性化が神経細胞傷害に働き、²⁷⁾ 逆に Fra-2

や ATF-2 の活性化が傷害保護的に働く^{28,29)} という知見と合わせると、TMT がマウス DG 顆粒細胞を特異的に傷害するのは、傷害保護的に働く Fra-2 や ATF-2 の活性化が DG では起こらないためだと考察できる。²⁵⁾

マウスにおける TMT 投与モデルは、これまで盛んに研究されてきた他の海馬傷害モデルとは異なり CA1 領域がほとんど傷害を受けない。このことは、TMT 投与マウスが、海馬神経細胞の脆弱性の領域による差異や、海馬歯状回細胞の機能的役割を解析できる、1 つの有用な動物モデルになることを示すと考えられる。

2-2. トリメチルスズ投与後にみられる海馬神経新生 近年の研究から、側脳室周囲の subventricular zone (SVZ) や海馬 DG 領域の subgranular zone (SGZ, Fig. 1) を始めとする種々の中枢・末梢神経組織には、神経及びグリア細胞への分化能及び増殖性を有する“神経幹細胞”が存在することが明らかとなっている。³⁰⁻³³⁾ 特に SGZ で新生した神経は、DG 領域に移行したのち、樹上突起及び軸索を伸ばし、嗅内皮質の情報を CA3 へ伝える顆粒細胞へと成熟・分化することが知られている。⁴⁾ 一方で海馬 SGZ の神経新生は、種々のホルモン投与や精神的ストレス、グルタミン酸シグナルの阻害、個体の運動、豊かな環境下での飼育で促進されるほか、⁴⁾ 全脳虚血や痙攣、カイニン酸投与などの海馬 CA1 傷害モデルや、^{4,21)} TMT による海馬傷害モデル^{26,34-36)} でも確認されている。Harry らは、生後 3

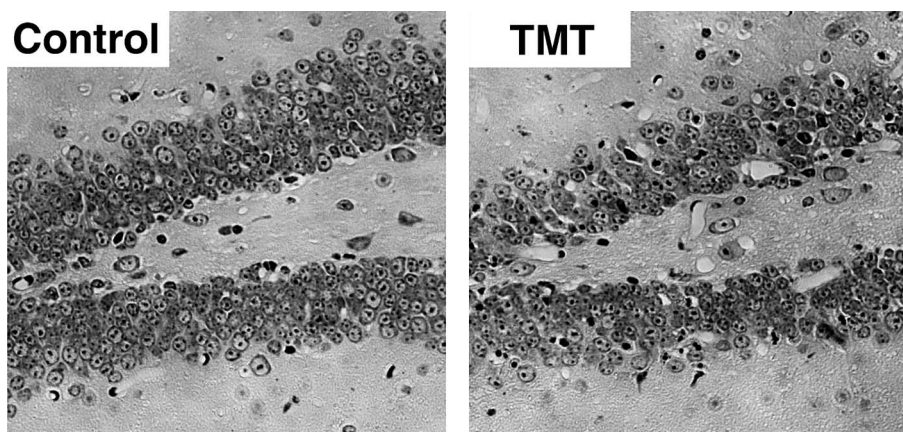


Fig. 2. TMT-induced Neurodegeneration in Mouse Dentate Gyrus

Adult ICR mice injected with saline (Control) or 2.8 mg/kg trimethyltin chloride (TMT) were perfused with 4% paraformaldehyde after 3 days of TMT injection, and hippocampal sections from each mice were stained with cresyl violet. Note severe neuronal loss was observed in the molecular and granule cell layers of dentate gyrus in mice injected with TMT.

週の若齢 CD-1 マウスに TMT を投与すると、投与 3 日後の海馬で cyclin D1 等の細胞周期の活性化因子が発現亢進することを見出し、³⁴⁾ また神経幹細胞マーカーの nestin 等を発現する細胞が海馬 DG 領域で増加すること、TMT 投与後 3 日間に増殖した細胞 (BrdU を取り込んだ細胞) は投与 2 週間後において成熟神経細胞マーカー NeuN を発現することを示し、³⁵⁾ 本モデルにおける神経新生の存在を示唆した。一方で荻田らは、成体の ddY マウスでも同様に BrdU 陽性細胞、nestin 発現細胞の増加が認められることを示すとともに、nestin と BrdU の共陽性細胞が、hilus や molecular layer ではなく、定常時に神経新生が起きているとされる SGZ に豊富に認められることを明らかにした。²⁶⁾ さらに興味深いのは、本実験系では TMT 投与の 2 日後に DG の顆粒細胞数が定常時の約 30% まで減少するのに対し、投与の 3~7 日後では細胞数が 80% 以上まで増加し、その後 56 日目まで同程度の細胞数を示したことである。²⁶⁾ また神経細胞マーカー NeuN、MAP2 の海馬での発現変化も、同様に TMT 投与 2 日目をピークとする一過性の減少を示したことから、本実験系では神経細胞死と神経新生の両方が起きていることが示された。²⁶⁾

また荻田らは、TMT 傷害が強度に認められる TMT 投与 4 日目では新規物体認識試験での記憶形成能が完全欠損するのに対し、DG の細胞数が 80% まで改善される投与 14 日目では TMT 非投与群と同等の記憶・学習能が認められることも明らかにした。²⁶⁾ 海馬の神経細胞死が記憶障害の直接原因と考えられることは前節でも述べた通りであるが、DG は海馬への情報入力の入り口であることから、その特異的障害が海馬全体の障害と同等の学習障害を惹起するとされている。³⁷⁾ なお SGZ の神経新生が特定の連合学習 (不連続に時間を隔てた 2 つの事柄を関連付ける学習) に関与すること、^{38,39)} あるいは海馬神経新生が情動の制御に関与すること⁴⁰⁾ など、最近では神経新生と脳機能制御との関連を示唆する報告が相ついでおり興味深い。

また最近、CA1 特異的な神経細胞死を惹起するとされた脳虚血モデルでも、CA1 傷害に先だち DG 領域にアポトーシス様細胞死が観察されることが報告された。⁴¹⁾ DG 領域ではファゴサイトーシスや神経新生が盛んなため形態上の細胞死が観察され

ない可能性があり、前節で述べた海馬の領域特異的な細胞死には、一部、各病態モデルにおける DG 神経障害及び神経新生活性化の程度の違いが関与する可能性もある。

いずれにしても、マウスへの TMT 投与は DG 顆粒神経細胞の動態に劇的な変化を惹起する。したがって本モデルは領域 DG の神経細胞死脆弱性と神経新生機能、すなわち DG 領域の神経細胞機能を明らかにする上で有用なモデルになると考えられる。

3. TMT による神経細胞傷害の分子メカニズム

以上のように、TMT の毒性研究は、現在、特に海馬神経細胞に着目した研究が精力的になされている。TMT 傷害は、急激な神経脱落の一方、核クロマチンの凝集や DNA 断片化を伴うことから、ネクロシスとアポトーシスの両方を含む傷害だと考えられている。⁴⁾ また TMT 傷害に伴い、ミトコンドリア機能変化⁴²⁾ や、グルタミン酸、⁴³⁾ 活性酸素種 (reactive oxygen species)、^{42,44)} サイトカイン類^{24,45-47)} 含量の増加が認められ、これらの細胞器官/分子の関与が示唆されている。また TMT はアストロサイトやミクログリア等のグリア細胞を活性化することや、^{10,24,45-47)} TMT による神経細胞死がミクログリアとの共培養系では認められないことから、⁴⁷⁾ グリア細胞の関与も示唆されている。一方で、このように単に TMT 投与に伴う表現型変化を評価するのではなく、受容体作用薬や、遺伝子改変動物を用いることでその傷害メカニズムを明らかにしようとする研究もなされてきている。本節では、これらの分子毒性的視点により TMT 毒性発現の分子メカニズムを解析した研究をまとめる。

3-1. Stannin 遺伝子 1990 年、“TMT に反応する細胞には、その反応に係わる特異的遺伝子が発現する”という仮説の基、サブトラクション法による遺伝子探索を行われ、TMT 投与で脳内発現が減少する遺伝子として Stannin (Snn) が同定された。⁴⁸⁾ Snn は 88 アミノ酸残基からなる細胞膜 1 回貫通型蛋白で、脳では海馬神経細胞層や嗅皮質に、末梢では腎臓や脾臓など TMT によって傷害が報告されている臓器/細胞群に特異的な発現が観察された。^{16,49)} Snn に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置によって TMT による細胞死が抑制されること、⁵⁰⁾ TMT 毒性に抵抗性を示す NIH-3T3 細胞に Snn を発現させることで TMT による細胞死が誘導

されるようになることから,⁵¹⁾ Snn は有機スズの毒性発現に係わる主要メディエーターとして働くことが示唆されている (Fig. 3). しかし, TMT は海馬神経細胞にカスパーゼ依存的な細胞死を引き起こすのに対し,⁵²⁾ Snn 過剰発現 NIH-3T3 細胞ではカスパーゼ誘導が認められないことから,⁵¹⁾ TMT の毒性は Snn 以外の経路を介しても発現することが考えられている. なお, TNF- α 処置を行った血管内皮細胞で Snn が増加すること, 炎症モデル動物の大動脈で Snn が著しい発現亢進を示すことが報告されている.⁵³⁾ このことは Snn が炎症や TNF- α 作用の発現に関与する因子であることを示すものであり, 近年では, TMT の毒性発現に加え, 炎症時の細胞増殖や細胞死抵抗性における Snn の役割が注目されている. これら一連の研究は Billingsley らによって行われているが,⁵⁴⁾ 生物種間における分子の高いアミノ酸相同性のため抗体による発現解析等がまだ十分になされていないのが現状である. 今後は本分子の遺伝子改変動物などを用いた解析が望まれる.

3-2. Nuclear Factor kappa B (NF-kB) 遺伝子

NF-kB は, p50, p100 等のホモダイマーあるいはヘテロダイマーで構成される転写因子で, 通常 I κ B 蛋白の結合で活性が抑制されているが, 種々の炎症/組織傷害時に活性化され, 種々の炎症関連分子群の転写調節に関与するとされる.⁵⁵⁾ TMT 毒性における NF-kB の役割は, 特に活性化 p50 を認識する抗体 (I κ B と結合していない NF-kB を認識する抗体) と, p50 遺伝子の各種改変動物の利用による, Pennypacker らの一連の研究から解析されている.^{56-59,61)} まず TMT 処置あるいは脳虚血 (MCAO)

処置後の海馬では, とともに海馬 CA 及び DG 領域の神経細胞層特異的な NF-kB の活性化が認められ, 抗活性化 p50 抗体とアポトーシス細胞を認識する Fluoro-Jade との共染色の解析から, 海馬で生き残った神経細胞のみが活性化 p50 の発現を亢進することが見出された.⁵⁶⁾ そこで p50 の遺伝子欠損マウス (p50-KO) を用いて検討したところ, p50-KO では TMT 投与 7 日後における神経細胞死が, 野生型マウスと比較して約 5 倍に増加しており, また TMT 投与後に死亡する個体数も, p50-KO では野生型の約 2 倍に増加していた.⁵⁷⁾ したがって TMT 傷害時に活性化される NF-kB は, 傷害に対し保護的な役割を果たすこと, そして神経細胞死の程度は個体死と相関する可能性が示された (Fig. 3). また Pennypacker らは, TMT 傷害における p50 の神経細胞生存維持作用について, 網羅的発現プロファイリングによる検討も行っている.^{58,59)} 彼らは, TMT 投与に伴い野生型マウスで 2 倍以上の発現増加を示し, p50-KO で発現増加を示さない遺伝子を探索したところ, 17 個の TMT 毒性関連遺伝子を同定した. これらの遺伝子は, 炎症関連物質, 細胞内シグナル伝達, 細胞内輸送 (熱ショック蛋白), リソソーム酵素, 細胞表面蛋白の 5 つのカテゴリーに属したことから, p50 を介したシグナルが炎症性細胞の遊走や, 蛋白分解, そして神経再構築に関与する遺伝子群の発現誘導に特異的に関与することが示唆された. しかしこれら遺伝子のプロモーター領域には, 明確な NF-kB に対するシスエレメントは存在せず, GC リッチかつ TATA レスのプロモーターであった.^{58,59)} このことは NF-kB が TMT による傷害をその下流で直接阻害しているというより

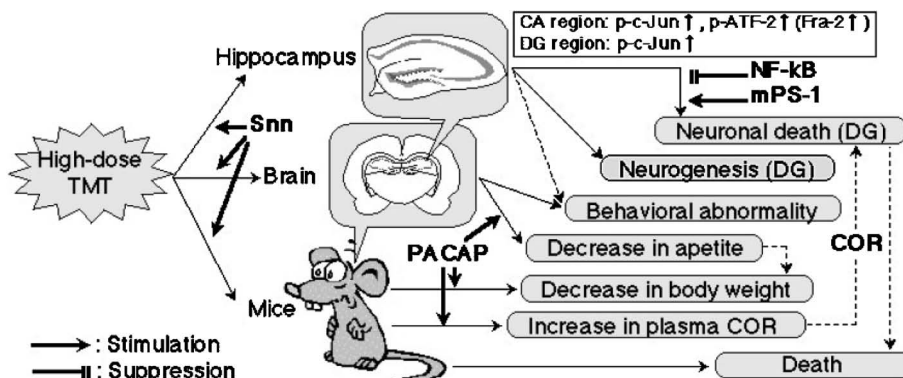


Fig. 3. Postulated Molecular Mechanisms for the TMT Toxicity

は、むしろ、TMT 傷害によって誘導されるシグナルに対して NF- κ B の活性化が間接的に拮抗する可能性を示すものである。ところで p50-KO の海馬神経の脆弱性については、同じ MCAO モデルでの神経細胞死の検討では CA1 神経細胞死の軽減⁶⁰と増悪⁶¹が報告されており、議論となっている。同じく CA1 傷害を惹起するカイニン酸投与モデルでは、神経細胞死の増悪が認められているが、⁶² NF- κ B が神経細胞の脆弱性に対してどのように関与しているのかについては、今後、実験モデルなどの違いに着目した検討によって慎重に評価されるべきであろう。

3-3. アルツハイマー病関連遺伝子 家族性アルツハイマー病の研究から、その疾患原因遺伝子として、アミロイド前駆蛋白遺伝子 (amyloid protein precursor, APP) や、その蛋白プロセッシングに係わるとされる presenilin 1 遺伝子 (PS-1)、presenilin 2 遺伝子 (PS-2)、そして脂質輸送に関係するアポリポ蛋白 E 遺伝子 (ApoE) が同定された。そしてその後の研究により、現在では、APP から生成されるアミロイド β 蛋白 (A β) の脳内での過剰蓄積が、家族性及び孤発性アルツハイマー病の引き金になると考えられている (アミロイド仮説)。一方ラットの TMT 投与モデルでは、APP mRNA の発現細胞数が海馬 CA1 領域で増加し、APP mRNA のスプライスバリエーション APP-695 と APP-751 のうち APP-751 のシグナル強度のみが発現増加する (APP-751/APP-695 比の増加)。⁶³ また APP containing Kunz protease inhibitor domain (APP-KPI)、PS-1、IL-1 β などの発現変化も報告されている。⁶⁴ これらの結果は、TMT 投与で惹起される海馬神経細胞死、記憶の減弱、情動変化 (攻撃性の増大) などの表現型変化に加え、海馬内で TMT により惹起される各種遺伝子の発現変化様式もまた、ヒトアルツハイマー病態に類似することを示しており、本モデルがアルツハイマー病の病因解析などに有用なモデルになるものと考えられている。⁶³⁻⁶⁶ なお現在までに、以下の 2 つの遺伝子改変マウスを用いた解析が行われている。

まず早発性アルツハイマー病と関連がある PS-1 について、常染色体優性遺伝を示す家族性アルツハイマー病の原因である、ミスセンス変異遺伝子 (mutPS-1) の過剰発現マウス (mutPS-1 Tg) での検討がなされている。⁶⁵ MutPS-1 Tg では、TMT 投

与 7 日後で海馬のアポトーシス様細胞数が約 3 倍に増加していた。また TMT による致死性 (LD₅₀ 値) も mutPS-1 Tg では低用量側にシフトしており、2.25 mg/kg の用量では、野生型では 25% のマウスが死亡するのに対し、mutPS-1 Tg では 51% と約 2 倍に増加していた。これらの表現型は前述の p50-KO と類似しており、実際に mutPS-1 Tg では、TMT 投与後に海馬での NF- κ B 活性化が認められなかった。したがって PS-1—NF- κ B シグナルが TMT による海馬神経傷害に対して保護的に働くことが示唆された (Fig. 3)。

また晩発性アルツハイマー病と関連する ApoE 遺伝子については、ヒトで低密度リポ蛋白 (LDL) の増加や、冠状動脈疾患、アルツハイマー病発症リスクの増加を示すとされる ApoE4 アレルを過剰発現させたマウス (ApoE4-Tg)、及び ApoE 欠損マウス (ApoE-KO) での検討がある。⁶⁶ TMT 投与に伴う海馬の遺伝子発現変化を解析したところ、生後 21 日齢のマウスでは野生型と同様に炎症性サイトカインである TNF- α 、MIP-1 α 、TGF- β 1 について ApoE-KO、ApoE4-Tg で有意な上昇あるいは上昇傾向が認められたが、生後 8 ヶ月齢では、定常時の TNF- α や MIP-1 α の発現が野生型と比較して ApoE-KO、ApoE4-Tg で有意に増加していた。また野生型マウスへの TMT 投与では誘導されない EB22 分子 (内因性のプロアゼインヒビター) が、両遺伝子改変マウスで共通して誘導された。したがって ApoE 遺伝子の欠損あるいは遺伝子変異は、加齢に伴った神経傷害関連反応 (炎症反応) に関与していることが示唆された。⁶⁶

以上の結果は、PS-1 分子や ApoE 分子が TMT による海馬毒性の発現に関与することを直接的に示すものである。しかし一方で、TMT を“アルツハイマー病を惹起する (アルツハイマー病の進行を促進する) 1 つの環境因子”として捉えれば、これらの結果は、まさに遺伝的脆弱性と環境因子の係わりを解析した研究とも位置付け可能である。すなわちこれらの結果は、msPS-1 や ApoE がアルツハイマー病の病態感受性遺伝子であることを示唆する 1 つの実験的成果と言える。

3-4. コルチコステロン 血中コルチコステロン (COR) 量の変動は、ヒトにおける記憶低下や海馬の萎縮、⁶⁷ げっ歯類における CA3 及び DG 領

域の細胞死との関連が示唆されており、欠乏しても過剰分泌されても海馬機能に悪影響を及ぼす。⁶⁸⁻⁷⁰⁾ 一方げっ歯類への TMT 投与では、血中コルチコステロン量の持続的増加を引き起こすことから、⁷⁰⁻⁷²⁾ このコルチコステロン上昇が2次的に海馬傷害を惹起している可能性がある。この可能性については、加藤らによって一連の解析がなされた。⁷²⁻⁷⁵⁾ まず副腎摘出 (ADX) により血中のコルチコステロン濃度を消失させたラットでは、TMT による神経細胞死及びアストログリア活性化が大きく促進された。⁷³⁾ また ADX 後にコルチコステロンあるいは II 型グルココルチコイド受容体作用薬のデキサメタゾン投与を行うと、TMT による神経系傷害や⁷²⁾ サイトカイン誘導⁷³⁾ が有意に減弱することから、定常状態で血中に存在するコルチコステロンは TMT による神経傷害に対し保護的に働くことが示唆された。しかし一方で、グルココルチコイドの合成阻害剤であるメチラポンを併用 (TMT による血中コルチコステロン量の持続的増加をブロック) すると、やはり TMT による細胞死や記憶障害が抑制された。⁷³⁾ よって血中のコルチコステロンは、欠乏しても過剰に分泌されても神経細胞に対して傷害的に働くことが本モデルでも確認され、また TMT 誘発の海馬傷害における末梢コルチコステロン量増加の関与も示唆された。

TMT は海馬培養切片において神経細胞死を誘発することから、²²⁾ 海馬神経を直接傷害するのは明らかであろう。しかし以上の結果は、TMT が末梢の機能変化を介して2次的に海馬傷害を惹起することを示す結果であり (Fig. 3), *in vivo* での毒性評価には、単一組織ではなく、毒性の影響を受け得る複数の組織に注目した多角的視点での検討が必要であることを端的に示したものと言える。なお血中コルチコステロンの上昇は、神経新生を抑制することも報告されている。⁶⁹⁾ したがって今後は、海馬 DG 領域という一領域の機能変化についても、細胞死と神経新生、両方の視点からの評価が必要だろう。

3-5. Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) 遺伝子 “毒性の影響を受け得るすべての組織に注目した多角的な視点での検討”は、裏を返せば、それらの総体的評価により各生体機能の階層性・独立性の解明にも貢献する。例えばコルチコステロンの結果は、中枢神経細胞死の

上流に末梢コルチコステロン量の増加が存在することを示す結果と言える。一方筆者らは、神経ペプチド PACAP の遺伝子欠損マウス (PACAP-KO) の TMT 毒性解析から、これに関するいくつかの知見を得ている。PACAP は下垂体のアデニル酸シクラーゼの活性化を指標にヒツジ視床下部より単離・同定された神経ペプチドであり、^{76,77)} その単離の経緯から、hypothalamus-pituitary-adrenal 系 (HPA axis) の制御に重要な役割を果たす因子と考えられていた。しかし 1990 年代後半から、神経系細胞の傷害保護⁷⁸⁻⁸⁰⁾ や、分化促進作用、^{81,82)} そして神経幹細胞の増殖調節作用^{83,84)} が報告され、また 2000 年以降では、主に筆者らの研究によって記憶や情動などの高次脳機能調節における重要性が見出され、⁸⁵⁻⁸⁷⁾ 中枢・末梢神経の機能制御を担う重要な分子であることが明らかとなりつつある。一方でこれらの知見は、コルチコステロン分泌、神経細胞傷害、神経新生、そして記憶、情動など、まさに TMT によって障害を受ける生体機能が、PACAP で制御される可能性を示す。そこで筆者らは、TMT 毒性発現における内因性 PACAP の役割について、ICR を遺伝的背景に有する PACAP-KO を用いた検討を行った。⁸⁸⁾ まず TMT 投与後の痙攣等の行動異常発現は野生型とほぼ同程度であったことから、両遺伝子型で TMT の脳内移行や行動に及ぼす毒性の程度には大差がないことが示された。しかし野生型では、先の ddY マウスでの神経細胞死の時間的変化と同様に、投与 2 日後をピークとする一過性の体重減少が認められたのに対し、PACAP-KO では有意な変化が認められなかった。また野生型の体重減少は摂食量、飲水量の減少を伴っていたが、PACAP-KO マウスではいずれの変化も認められなかった。さらに野生型では TMT 投与 24 時間で血中コルチコステロン量が約 5 倍に増加したが、驚くことに PACAP-KO ではこの上昇もほぼ完全に消失していた。以上の結果は、内因性の PACAP が TMT による摂食・飲水や体重の減少、そして血中コルチコステロン上昇に関与する一方で、行動学的な毒性には関与しないことを示す。そしてこれらは、TMT による血中コルチコステロン上昇等の末梢の変化が、行動異常誘発とは独立した生体反応制御系によって制御されることを示す結果でもある (Fig. 3)。現在、TMT による海馬細胞死や神経新

生について検討を行っているところであり、これらの機能変化が、今回変化を見出した現象と独立するのか、あるいは1つのカスケードで説明できるのかについても明らかにできると考えられる。そしてこれらの知見は、TMT毒性におけるPACAPの役割に留まらず、特に海馬が担う複雑な生命機能の一端を理解する上で有用な研究になるのではないかと期待している。

4. おわりに

本総説で述べたように、近年のTMT研究は、海馬神経新生に関する研究や、各種遺伝子改変マウスを用いた研究が増えており、丁度、新しい局面を迎えていると考えられる。

海馬神経新生については、マウスでのTMTによるDG特異的傷害モデルが、DGの細胞機能を解析する上で有用なモデルであることを紹介した。海馬神経は、アルツハイマー病や脳虚血などの中枢病態時に傷害され、そのほとんどで神経新生が認められることから、神経新生研究はこれら病態を考察する上で有用な知見を与えるであろう。

また遺伝子改変マウスは、認められた表現型の要因の1つを遺伝子に帰することができることから極めて有用な研究ツールであることは言うまでもないが、1) 遺伝子改変動物を用いた実験では従来のアゴニスト・アンタゴニストを用いた実験と比べて同等あるいはそれ以上の表現型変化が観察されるため、微小な機能変化(遺伝子の発現変化を含む)を高感度に検出できる、2) 遺伝子欠損マウスの多くは個体全身の特定分子が欠失しているため、一般に全身性の暴露が行われる化学物質・環境因子について、その発現メカニズムを1つの動物で総体的に評価できる、という2点において今後の薬理学/毒性的研究に大きく貢献すると考えられる。なお今回、p50-KOのように純粋に創薬ターゲットとしての機能評価を志向した研究、アルツハイマー病における遺伝的因子×環境因子関連を解析した研究、PACAP-KOのように生体機能の調節機構解明に寄与すると考えられる研究を紹介した。このように、それぞれの研究者の独自の視点からの研究、考察を行うことが可能であることから、今後遺伝子改変動物を用いた研究が盛んになされ、多くの有用な知見が得られることが期待される。

謝辞 TMT毒性に関する研究についてご協力を頂いた森田佳子博士、西山徳人修士、柳田大輔修士に感謝致します。また総説中に引用した研究の一部は、文部省科学研究費補助金によってなされたものであり、ここに深謝致します。

REFERENCES

- 1) A preliminary Symposium Communication with the Abstracts: *Neurotoxicology*, **3**, 128-139 (1982).
- 2) Krigman M. R., Silverman A. P., *Neurotoxicology*, **5**, 129-140 (1984).
- 3) Silverman A. P., *Neurotoxicology*, **5**, 297-300 (1984).
- 4) Harry G. J., Lefebvre d'Helencourt C., *Neurotoxicology*, **24**, 343-356 (2003).
- 5) Brown A. W., Aldridge W. N., Street B. W., Verschoyle R. D., *Am. J. Pathol.*, **97**, 59-74 (1979).
- 6) Bouldin T. W., Goines N. D., Bagnell R. C., Krigman M. R., *Am. J. Pathol.*, **104**, 237-249 (1981).
- 7) Hagan J. J., Jansen J. H., Broekkamp C. L., *Neurotoxicology*, **9**, 53-74 (1988).
- 8) Haga S., Haga C., Aizawa T., Ikeda K., *Acta Neuropathol.*, **103**, 575-582 (2002).
- 9) Niittykoski M., Lappalainen R., Jolkkonen J., Haapalinna A., Riekkinen P. Sr., Sirvio J., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **22**, 735-750 (1998).
- 10) Ishida N., Akaike M., Tsutsumi S., Kanai H., Masui A., Sadamatsu M., Kuroda Y., Watanabe Y., McEwen B. S., Kato N., *Neuroscience*, **81**, 1183-1191 (1997).
- 11) Chang L. W., Hough A. J., Cockerill D., *Biomed. Environ. Sci.*, **2**, 54-64 (1989).
- 12) Ekuta J. E., Hikal A. H., Matthews J. C., *Toxicol. Lett.*, **95**, 41-46 (1998).
- 13) Feldman R. G., White R. F., Eriator I. I., *Arch. Neurol.*, **50**, 1320-1324 (1993).
- 14) Yanofsky N. N., Nierenberg D., Turco J. H., *J. Emerg. Med.*, **9**, 137-149 (1991).
- 15) Kreyberg S., Torvik A., Bjorneboe A., Wiik-Larsen W., Jacobsen D., *Clin. Neuropathol.*, **11**, 256-259 (1992).
- 16) Horiguchi T., Shiraishi H., Shimizu M., Morita M., *Environ. Pollut.*, **95**, 85-91 (1997).
- 17) Nakanishi T., Nishikawa J., Hiromori Y., Yokoyama H., Koyanagi M., Takasuga S.,

- Ishizaki J., Watanabe M., Isa S., Utoguchi N., Itoh N., Kohno Y., Nishihara T., Tanaka K., *Mol. Endocrinol.*, **19**, 2502–2516 (2005).
- 18) Osada S., Nishikawa J., Nakanishi T., Tanaka K., Nishihara T., *Toxicol. Lett.*, **155**, 329–335 (2005).
- 19) Dejneka N. S., Patanow C. M., Polavarapu R. P., Toggas S. M., Krady J. K., Billingsley M. L., *Neurochem. Int.*, **31**, 801–815 (1997).
- 20) Pulsinelli W. A., *Prog. Brain Res.*, **63**, 29–37 (1985).
- 21) Tanaka H., Grooms S. Y., Nennett V. L., Zulkan R. S., *Brain Res.*, **886**, 190–207 (2000).
- 22) Armstrong D. L., Read H. L., Cork A. E., Montemayor F., Wayner M. J., *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **8**, 637–641 (1986).
- 23) Chang L. W., Tiemeyer T. M., Wenger G. R., McMillan D. E., *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **4**, 149–156 (1982).
- 24) Fiedorowicz A., Figiel I., Kaminska B., Zaremba M., Wilk S., Oderfeld-Nowak B., *Brain Res.*, **912**, 116–127 (2001).
- 25) Ogita K., Nitta Y., Watanabe M., Nakatani Y., Nishiyama N., Sugiyama C., Yoneda Y., *Neuropharmacology*, **47**, 619–630 (2004).
- 26) Ogita K., Nishiyama N., Sugiyama C., Higuchi K., Yoneyama M., Yoneda Y., *J. Neurosci. Res.*, **82**, 609–621 (2005).
- 27) Bhakar A. L., Howell J. L., Paul C. E., Salehi A. H., Becker E. B., Said F., Bonni A., Barker P. A., *J. Neurosci.*, **23**, 11373–11381 (2003).
- 28) Robinson G. A., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **41**, 57–64 (1996).
- 29) Pennypacker K. R., Eidizadeh S., Kassed C. A., O'Callaghan J. P., Sanberg P. R., Willing A. E., *Neurosci. Lett.*, **289**, 1–4 (2000).
- 30) Gage F. H., *Science*, **287**, 1433–1438 (2000).
- 31) Sharp F. R., Liu J., Bernabeu R., *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **134**, 23–30 (2002).
- 32) Lichtenwalner R. J., Parent J. M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **26**, 1–20 (2006).
- 33) Taupin P., *C. R. Biol.*, **329**, 465–475 (2006).
- 34) McPherson C. A., Kubik J., Wine R. N., D'Hellencourt C. L., Harry G. J., *Neurotox. Res.*, **5**, 339–354 (2003).
- 35) Harry G. J., McPherson C. A., Wine R. N., Atkinson K., Lefebvre d'Hellencourt C., *Neurotox. Res.*, **5**, 623–627 (2004).
- 36) Corvino V., Geloso M. C., Cavallo V., Guadagni E., Passalacqua R., Florenzano F., Giannetti S., Molinari M., Michetti F., *Brain Res. Bull.*, **65**, 471–477 (2005).
- 37) Kesner R. P., Lee I., Gilbert P., *Rev. Neurosci.*, **15**, 333–351 (2004).
- 38) Shors T. J., *Trends. Neurosci.*, **27**, 250–256 (2004).
- 39) Aimoune J. B., Wiles J., Gage F. H., *Nat. Neurosci.*, **9**, 723–727 (2006).
- 40) Campbell S., Macqueen G., *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**, 417–426 (2004).
- 41) Honkaniemi J., Massa S. M., Breckinridge M., Sharp F. R., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **42**, 79–88 (1996).
- 42) LeBel C. P., Ali S. F., McKee M., Bondy S. C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 17–24 (1990).
- 43) Patel M., Ardel B. K., Yim G. K. W., Isom G. E., *Neurotoxicology*, **11**, 601–608 (1990).
- 44) Zhang L., Li L., Prabhakaran K., Borowitz J. L., Isom G. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **216**, 34–43 (2006).
- 45) McCann M. J., O'Callaghan J. P., Martin P. M., Bertram T., Streit W. J., *Neuroscience*, **72**, 273–281 (1996).
- 46) Rohl C., Sievers J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**, 36–45 (2005).
- 47) Eskes C., Juillerat-Jeanneret L., Leuba G., Honegger P., Monnet-Tschudi F., *J. Neurosci. Res.*, **71**, 583–590 (2003).
- 48) Krady J. K., Oyler G. A., Balaban C. D., Billingsley M. L., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **7**, 287–297 (1990).
- 49) Toggas S. M., Krady J. K., Billingsley M. L., *Mol. Pharmacol.*, **42**, 44–56 (1992).
- 50) Thompson T. A., Lewis J. M., Dejneka N. S., Severs W. B., Polavarapu R., Billingsley M. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 1201–1216 (1996).
- 51) Davidson C. E., Reese B. E., Billingsley M. L., Yun J. K., *Mol. Pharmacol.*, **66**, 855–863 (2004).
- 52) Jenkins S. M., Barone S., *Toxicol. Lett.*, **147**, 63–72 (2004).
- 53) Horrevoets A. J., Fontijn R. D., van Zonneveld A. J., de Vries C. J., ten Cate J. W., Pannekoek H., *Blood*, **93**, 3418–3431 (1999).
- 54) Billingsley M. L., Yun J., Reese B. E., David-

- son C. E., Buck-Koehntop B. A., Veglia G., *J. Cell. Biochem.*, **98**, 243–250 (2006).
- 55) Xiao G., Rabson A. B., Young W., Qing G., Qu Z., *Cytokine Growth Factor Rev.*, **17**, 281–293 (2006).
- 56) Pennypacker K. R., Kassed C. A., Eidizadeh S., Saporta S., Sanberg P. R., Willing A. E., *Exp. Neurol.*, **172**, 307–319 (2001).
- 57) Kassed C. A., Willing A. E., Garbuzova-Davis S., Sanberg P. R., Pennypacker K. R., *Exp. Neurol.*, **176**, 277–288 (2002).
- 58) Kassed C. A., Butler T. L., Patton G. W., Demesquita D. D., Navidomskis M. T., Memet S., Israel A., Pennypacker K. R., *FASEB J.*, **18**, 723–724 (2004).
- 59) Duckworth E. A., Butler T., Collier L., Collier S., Pennypacker K. R., *Brain Res.*, **1088**, 167–175 (2006).
- 60) Schneider A., *Nat. Med.*, **5**, 554–559 (1999).
- 61) Duckworth E. A. M., Butler T., Collier L., Collier S., Pennypacker K. R., *Brain Res.*, **1088**, 167–175 (2006).
- 62) Yu Z., Zhou D., Bruce-Keller A. J., Kindey M. S., Mattson M. P., *J. Neurosci.*, **19**, 8856–8865 (1999).
- 63) O’Connell A. W., Strada O., Earley B., Leonard B. E., *Neurochem. Int.*, **30**, 313–320 (1997).
- 64) Nilsberth C., Kostyszyn B., Luthman J., *Neurotox. Res.*, **4**, 625–636 (2002).
- 65) Kassed C. A., Butler T. L., Navidomskis M. T., Gordon M. N., Morgan D., Pennypacker K. R., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **110**, 152–157 (2003).
- 66) Harry G. J., Lefebvre d’Hellencourt C., Brucoleri A., Schmechel D., *Brain Behav. Immun.*, **14**, 288–304 (2000).
- 67) Lupien S. J., de Leon M., de Santi S., Convit A., Tarshish C., Nair N. P., Thakur M., McEwen B. S., Hauger R. L., Meaney M. J., *Nat. Neurosci.*, **1**, 69–73 (1998).
- 68) De Kloet E. R., Vreugdenhil E., Oitzl M. S., Joels M., *Endocr. Rev.*, **19**, 269–301 (1998).
- 69) Nichols N. R., Agolley D., Zieba M., Bye N., *Brain Res. Rev.*, **48**, 287–301 (2005).
- 70) Chang L.-W., Hough A.-J., Bivins F. G., Cockerill D., *Biomed. Environ. Sci.*, **2**, 54–64 (1989).
- 71) Cockerill D., Chang L.-W., Hough A.-J., Bivins F. G., *J. Toxicol. Environ. Health*, **22**, 149–161 (1987).
- 72) Tsutsumi S., Akaike M., Arimitsu H., Imai H., Kato N., *Exp. Neurol.*, **17**, 86–94 (2002).
- 73) Imai H., Nishimura T., Sadamatsu M., Liu Y., Kabuto M., Kato N., *Exp. Neurol.*, **171**, 22–28 (2001).
- 74) Liu Y., Imai H., Sadamatsu M., Tsunashima K., Kato N., *Neurosci. Res.*, **51**, 319–327 (2005).
- 75) Imai H., Kabuto M., Takita M., Kato N., *Neurotoxicology*, **19**, 163–166 (1998).
- 76) Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D., Coy D. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567–574 (1989).
- 77) Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 269–324 (2000).
- 78) Ohtaki H., Nakamachi T., Dohi K., Aizawa Y., Takaki A., Hodoyama K., Yofu S., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., Kopf M., Iwakura Y., Matsuda K., Arimura A., Shioda S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 7488–7493 (2006).
- 79) Shintani N., Suetake S., Hashimoto H., Koga K., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A., *Regul. Pept.*, **126**, 123–128 (2005).
- 80) Reglodi D., Somogyvari-Vigh A., Vigh S., Kozicz T., Arimura A., *Stroke*, **31**, 1411–1417 (2000).
- 81) Suh J., Lu N., Nicot A., Tatsuno I., DiCiccio-Bloom E., *Nat. Neurosci.*, **4**, 123–124 (2001).
- 82) Hashimoto H., Kunugi A., Arakawa N., Shintani N., Fujita T., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 337–343 (2003).
- 83) Mercer A., Ronnholm H., Holmberg J., Lundh H., Heidrich J., Zachrisson O., Ossoinak A., Frisen J., Patrone C., *J. Neurosci. Res.*, **76**, 205–215 (2004).
- 84) Hirose M., Hashimoto H., Iga J., Shintani N., Nakanishi M., Arakawa N., Shimada T., Baba A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1070**, 342–347 (2006).
- 85) Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori

- W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S., Baba A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13355–13360 (2001).
- 86) Tanaka K., Shintani N., Hashimoto H., Kawagishi N., Ago Y., Matsuda T., Hashimoto R., Kunugi H., Yamamoto A., Kawaguchi C., Shimada T., Baba A., *J. Neurosci.*, **26**, 5091–5097 (2006).
- 87) Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1070**, 75–89 (2006).
- 88) Morita Y., Yanagida D., Shintani N., Ogita K., Nishiyama N., Tsuchida R., Hashimoto H., Baba A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1070**, 450–456 (2006).