

有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸への曝露による神経変性機序の解明

菅原 由佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 増田 知之 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

2003年、茨城県神栖市の集合住宅において、高濃度の有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸 (DPAA) に汚染された井戸水による健康被害が生じた (Ishii *et al.*, 2004). ヒ素 (As) は半金属元素の一つとして知られ、自然界では主に無機ヒ素化合物や有機ヒ素化合物の形で存在する。今回井戸水から検出された DPAA は、自然界に存在しない人工有機ヒ素化合物であった。

今回の健康被害で、DPAA 曝露者は主に神経症状を訴えていた。井戸水を介して DPAA を慢性的に経口摂取していた期間は3~9年間と見積もられており、急性症状として手足の震えや記憶力障害、睡眠障害が見られた。さらに、健康被害の発覚後、長期的な経過観察を行ったところ、脳内の神経変性や神経細胞数の減少を伴う脳萎縮 (組織的病変)、ならびに前・後頭葉での脳内血流量の顕著な低下 (機能的病変) がみられた (Ishii & Tamaoka, 2015). これらの病変は、脳の老化現象が実年齢以上に促進された状態であることを示しており、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の病変と類似していた。

環境中のヒ素化合物は、飲用水や作物を介して体内に入ると、血液脳関門を微量ながら通過し、脳に達することが知られている。このことから、井戸水を介して長期的に DPAA を摂取した結果、住民の脳が DPAA に曝露し、上記のような健康被害をもたらした可能性が考えられた。

神経変性の指標となるタンパク質の一つとして、Tau が知られている。Tau は神経細胞内に発現する微小管結合タンパク質 (microtubule-associated proteins ; MAPs) の一つであり、微小管の合や細胞内輸送の安定化に重要なタンパク質である。通常 Tau は微小管との結合・遊離においてリン酸化の制御を受けるが、病的な状況に陥ると Tau が過剰にリン酸化され異常リン酸化 Tau が生じる (以下、リン酸化 Tau と表記)。リン酸化 Tau は微小管から遊離して集まり、オリゴマーを形成する。それらは細胞内凝集体となり、線維化して蓄積する (神経原線維変化)。また、Tau が遊離したことで微小管の不安定化や細胞内輸送障害が生じる。これらのことが原因となり、神経変性が引き起こされると考えられている (Ballatore *et al.*, 2007; Guerrero-Muñoz *et al.*, 2015).

本研究では、有機ヒ素化合物 DPAA による神経変性機序の解明を目的とし、DPAA 添加後の培養神経細胞における Tau・リン酸化 Tau のタンパク量変化に着目して、DPAA が神経変性の促進に直接関わる可能性について検討した。

【材料と方法】

実験には、マウス神経芽細胞腫由来の株化細胞である Neuro2a (N2a) 細胞 (以下、野生型を N2a-WT 細胞と表記)、およびヒト型 Tau (1N4R) を過剰発現させた N2a 細胞 (以下、N2a-MAPT 細胞と表記) を用意した。以下の手順に沿って、実験を進めた。

1. N2a-WT 細胞および N2a-MAPT 細胞を培養した。
2. 両細胞の細胞数を一定に調整し、24時間の血清飢餓処理を行った。
3. 両細胞の培地に DPAA を添加した。濃度条件は0 (対照群)、0.1, 1.0, 10, 50 (µg/ml) で設定し、添加後48時間培養した。
4. 両細胞とその培地を回収した。細胞形態を観察したのちにタンパク成分を抽出し、ウェスタンブロッティング法により総 Tau とリン酸化 Tau のタンパク量を調べた。

【結果】

半定量解析の結果、DPAA 濃度が 50 µg/ml の場合に、N2a-MAPT 細胞群における細胞内総 Tau 量とリン酸化 Tau 量が、対照群と比較して有意に増加していた。続いて、48時間培養後の培地を用いて細胞外 Tau の半定量解析を行った。その結果、細胞外総 Tau 量においても、対照群と比較して有意な増加がみられた。

これらの結果から、有機ヒ素化合物 DPAA が、神経変性の促進機序に関わる可能性が示唆された。

結果・考察の詳細は発表会にて提示する。

【参考文献】

- Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, Iwasaki N, Shin K, Matsui A, Endo G, Kumagai Y, Ishii T, Shoji S, Ogata T, Ishizaki M, Doi M, Shimojo N. 2004. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Annals of Neurology*. 56(5). 741-745. DOI 10.1016/j.toxlet.2013.10.013
- Ishii K, Tamaoka A. 2015. Ten-years records of organic arsenic (diphenylarsinic acid) poisoning: epidemiology, clinical feature, metabolism, and toxicity. *Brain and Nerve*. 67(1). 5-18. DOI 10.11477/mf.1416200081
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(9). 663-672. DOI 10.1038/nrn2194
- Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL. 2015. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9. 464. DOI 10.3389/fncel.2015.00464