

「合同研究会2019」第1部勉強会
環境過敏症・アレルギー患者の発生予防のためにできること
環境過敏症の病態に関する最近の知見の紹介



薬学研究者の立場から—
環境過敏症の発症メカニズム解明のための基盤研究

山國 徹

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野

2019年9月16日、 明治大学駿河台キャンパス

ネオニコチノイド系農薬とCSとの関連性

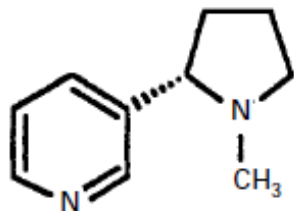
ネオニコチノイド系農薬は化学構造がタバコの成分ニコチンと類似の合成化学物質。
https://www.actbeyondtrust.org/neonico_leaflet/



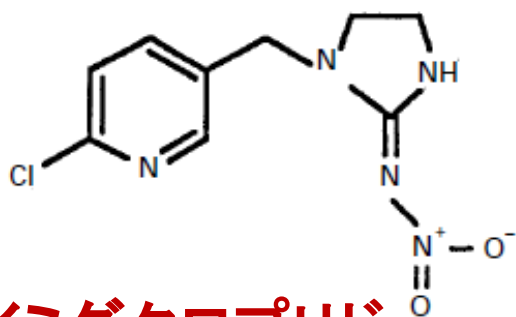
ネオニコチノイド系農薬を化学物質過敏症CSの発症に先立って暴露が確認された化学物質として報告(平 2006)

ネオニコチノイド系農薬は哺乳類等の脊椎動物より昆虫に対して選択的に強い神経毒性を持つため、ヒトには安全とされてきた。

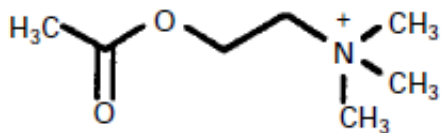
しかし、ヒトを含む哺乳動物における神経毒性発現やそのリスクを示唆する事実が報告されている。



ニコチン



イミダクロプリド



アセチルコリン

● イミダクロプリド (IMI) は国内法で劇物に分類。

□ 哺乳動物で低濃度・低用量のIMIの影響あり。

・1 μM のIMIがラット小脳神経細胞のカルシウムイオン流入の誘発 (Kimura-Kuroda et al., *PLoS ONE*, 2012)

・低用量 (8 mg/kg/day) IMIの3ヶ月間経口投与によるラットの認知機能障害 (Kara et al., *Int J Exp Pathol*, 2015; LD_{50} : 450 mg/kg)

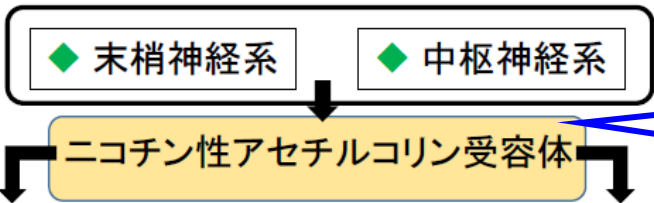
□ IMI製剤による住宅防蟻工事が原因の健康被害 (Taira, 26th JSCE Meeting, 2017)

□ 頻脈、血圧上昇、嘔吐、けいれんなどの急性中毒症状。

毒性発現の仕組みは不明である

イミダクロプリドが結合する哺乳類ニコチン性アセチルコリン受容体

● ニコチン性アセチルコリン受容体nAChRの生理機能

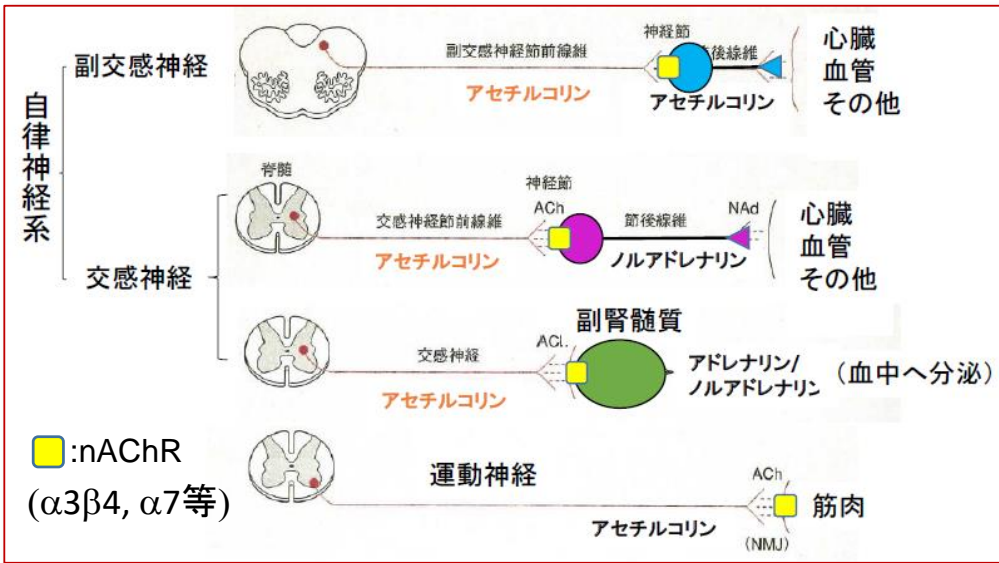


ニコチン性アセチルコリン受容体が開くと、細胞外のナトリウムイオン(Na^+)、カルシウムイオン(Ca^{2+})が細胞内に流入する。その結果、細胞の機能が変化する。

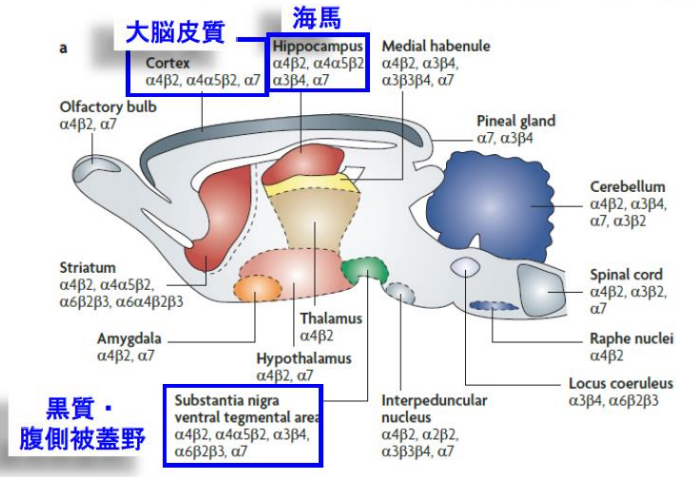
循環器系、消化器系や副腎髄質などの働きを適正に調節

海馬 — 脳の学習・記憶機能に不可欠
 中脳ドパミン神経 — 意欲・動機付けや運動始動に重要
 運動神経 — 筋収縮

恒常性の維持



哺乳類ニコチン性アセチルコリン受容体の脳内分布



哺乳類の内分系泌系細胞に対するイミダクロプリドの影響評価

イミダクロプリドの神経毒性作用 (仮説)



◆ Research Question1

血中アドレナリン濃度の上昇は頻脈、血圧上昇の原因になる。イミダクロプリドがアドレナリンを産生・分泌する副腎髄質細胞の機能を亢進させる可能性がある。そこで、低濃度のイミダクロプリドが副腎髄質細胞の機能(アドレナリン産生能)に影響を及ぼすか精査した。

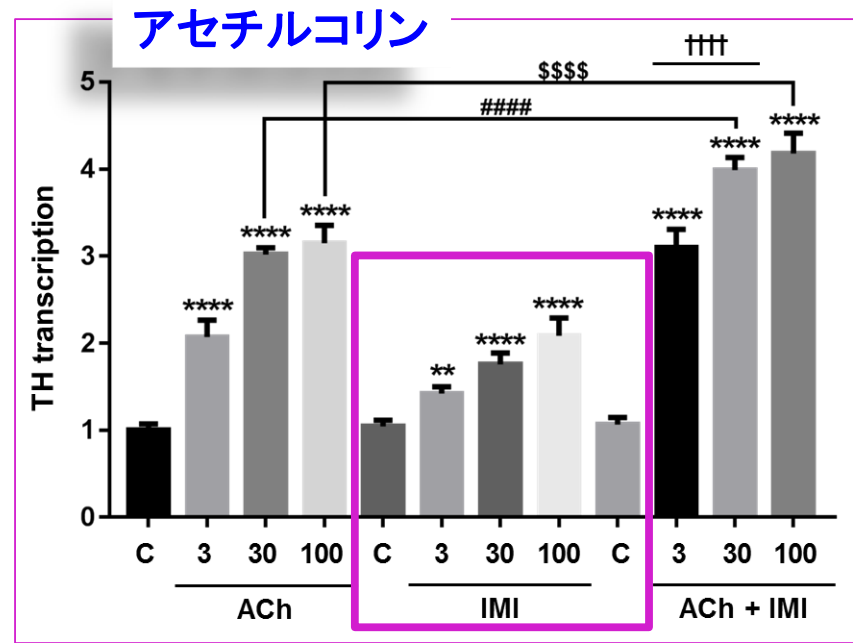
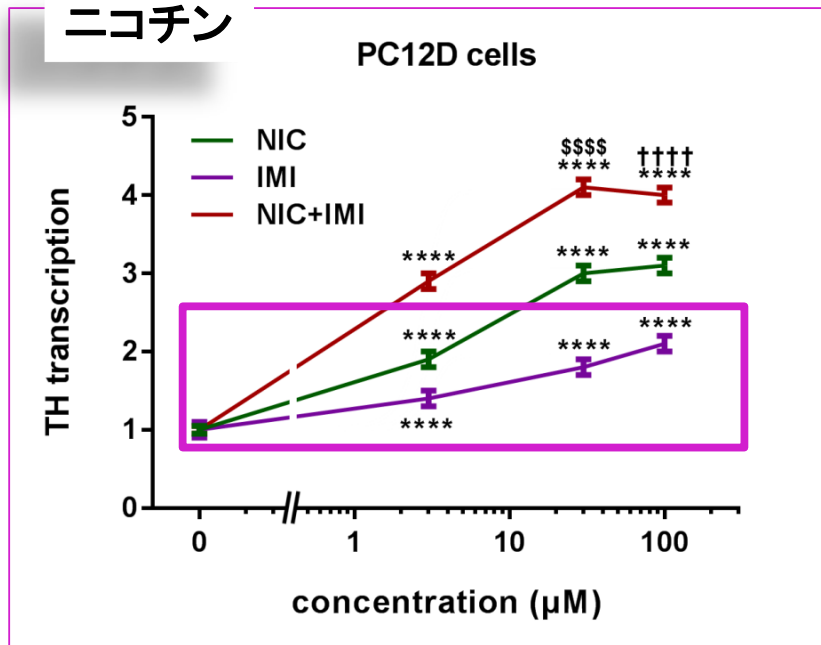
◆ Research Question2

低濃度のイミダクロプリドが細胞機能に影響を与える仕組みとして受容体数の増大(感受性の増大)が考えられる。このため、低濃度のイミダクロプリドが細胞膜(細胞表面)への受容体の集積を促すか精査した。

(ネオニコチノイド系農薬の時間累積毒性の検証)

ラット副腎髄質由来株細胞の転写に対するイミダクロプリドの影響

□ 単体で、しかも低濃度でチロシン水酸化酵素 (TH) の転写を促進



(Kawahata & Yamakuni, Toxicology 394,84-92,2018)

One-way ANOVA with post Tukey test. Values represent mean \pm SEM (n = 4).
Control: 0.1% DMSO; NIC: nicotine; IMI: imidacloprid.

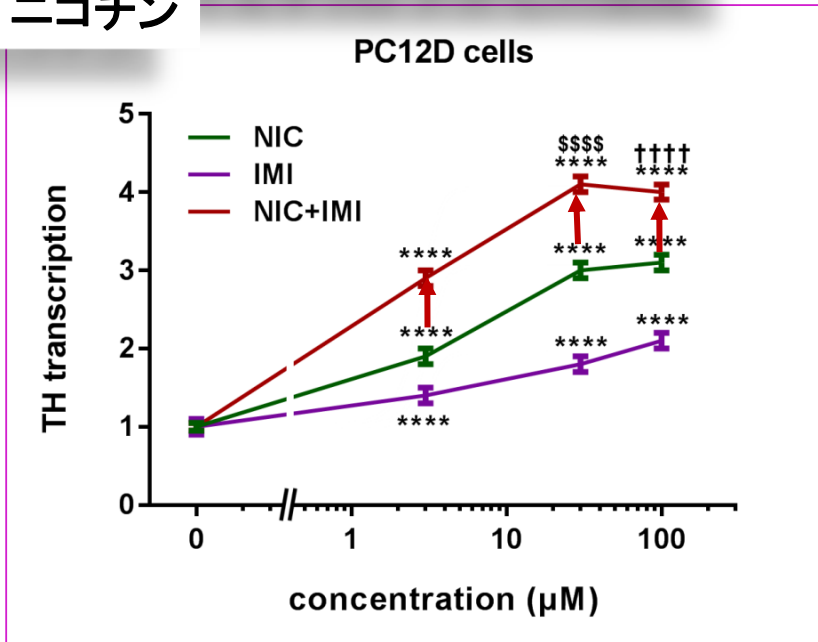
チロシン水酸化酵素 (TH) はアドレナリン生合成の律速酵素

ラット副腎髄質由来株細胞の転写に対するイミダクロプリドの影響

- 単体で、しかも低濃度でチロシン水酸化酵素 (TH) の転写を促進
- ニコチン (NIC)、アセチルコリン (ACh) の転写促進作用を増強

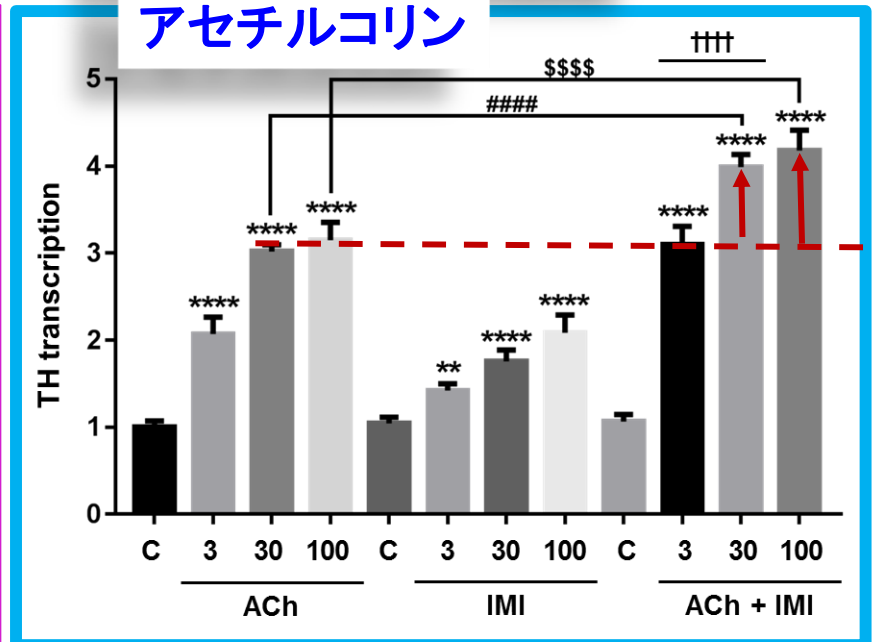
イミダクロプリドとの併用

ニコチン



イミダクロプリドとの併用

アセチルコリン



(Kawahata & Yamakuni, *Toxicology* 394,84-92,2018)

One-way ANOVA with post Tukey test. Values represent mean \pm SEM (n = 4).
 *** $p < 0.001$ vs. control. Control: 0.1% DMSO; IMI: imidacloprid.

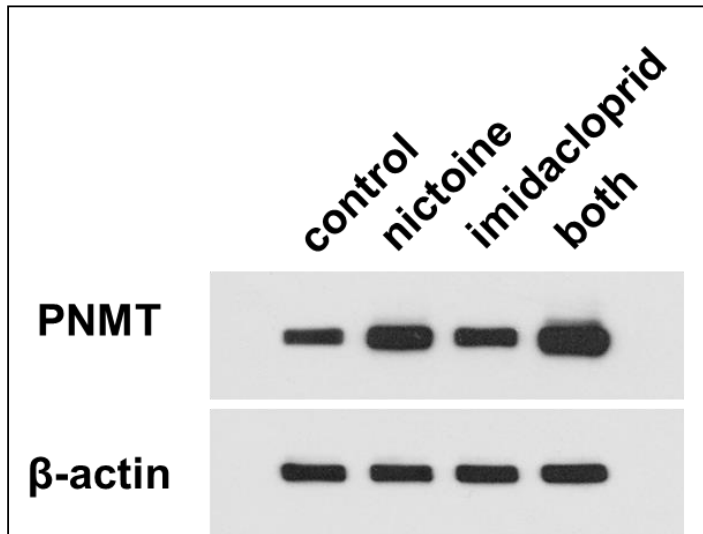
チロシン水酸化酵素 (TH) はアドレナリン合成の律速酵素

Research Question1

細胞を薬剤で48時間処置

初代培養副腎髄質細胞におけるPNMT発現とアドレナリン生合成に対するニコチン及びイミダクロプリドの影響

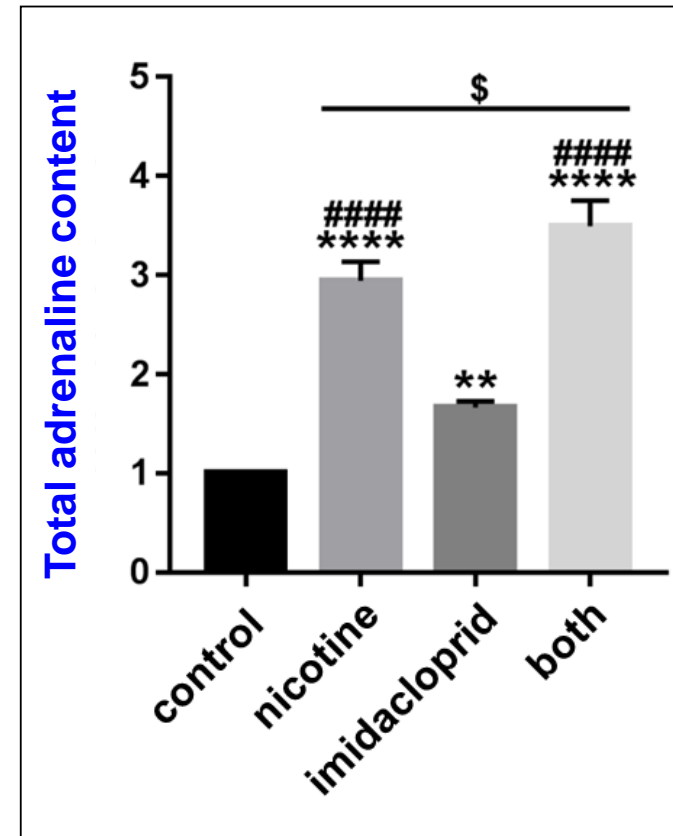
PNMTタンパクの発現



Cell lysates were subjected to WB analysis with anti-PNMT antibody.

PNMT:
フェニルエタノールアミン *N*-メチル基転移酵素
(アドレナリン合成酵素)

アドレナリン含有量

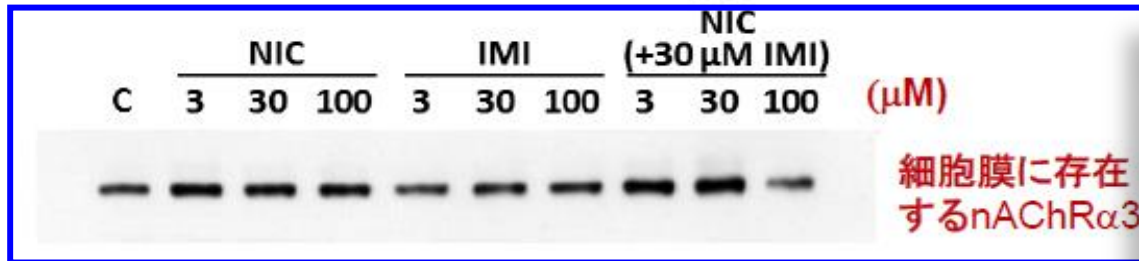


Values are mean \pm SEM (n = 3). ** p < 0.01, **** p < 0.0001 vs. control. #### p < 0.0001 vs. treatment with 30 μ M IMI alone. \$ p < 0.05 vs. treatment with 30 μ M nicotine alone.

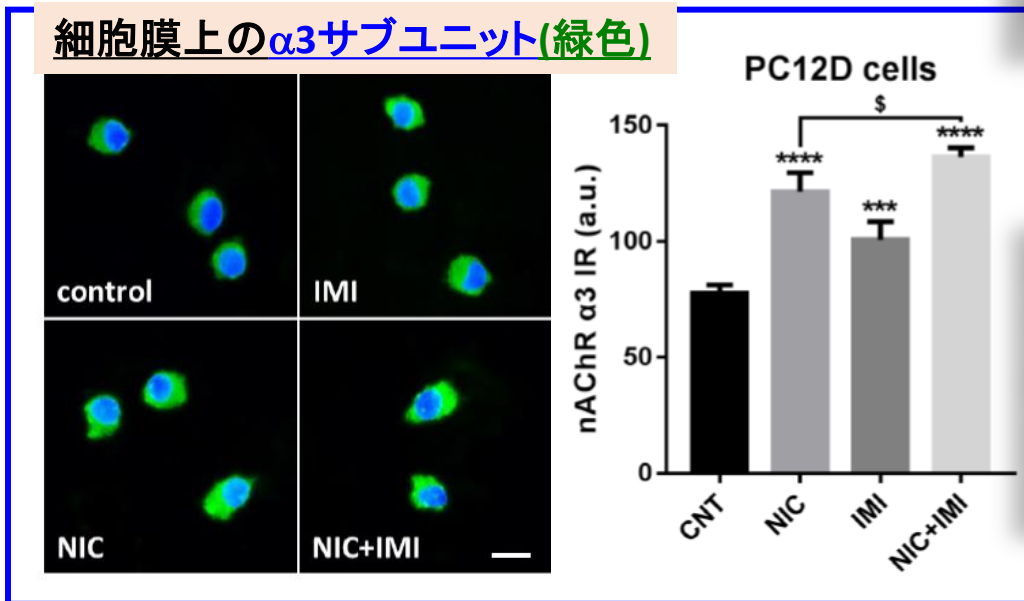
Research Question2

細胞を薬剤で48時間処置

副腎髄質由来株細胞PC12D細胞において、イミダクロプリド(IMI)はニコチン(NIC)と協働して、ニコチン性アセチルコリン受容体の細胞膜への集積を促進する



細胞を播種し(3x10⁵細胞/10 cm-dish)、2日間培養。薬物で48時間処置後、細胞表面タンパク質精製キット(EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotin、Thermo sicientific)で細胞表面タンパク質を回収。受容体(nAChRα3サブユニット)に対する抗体を用いてWB法で検出した。

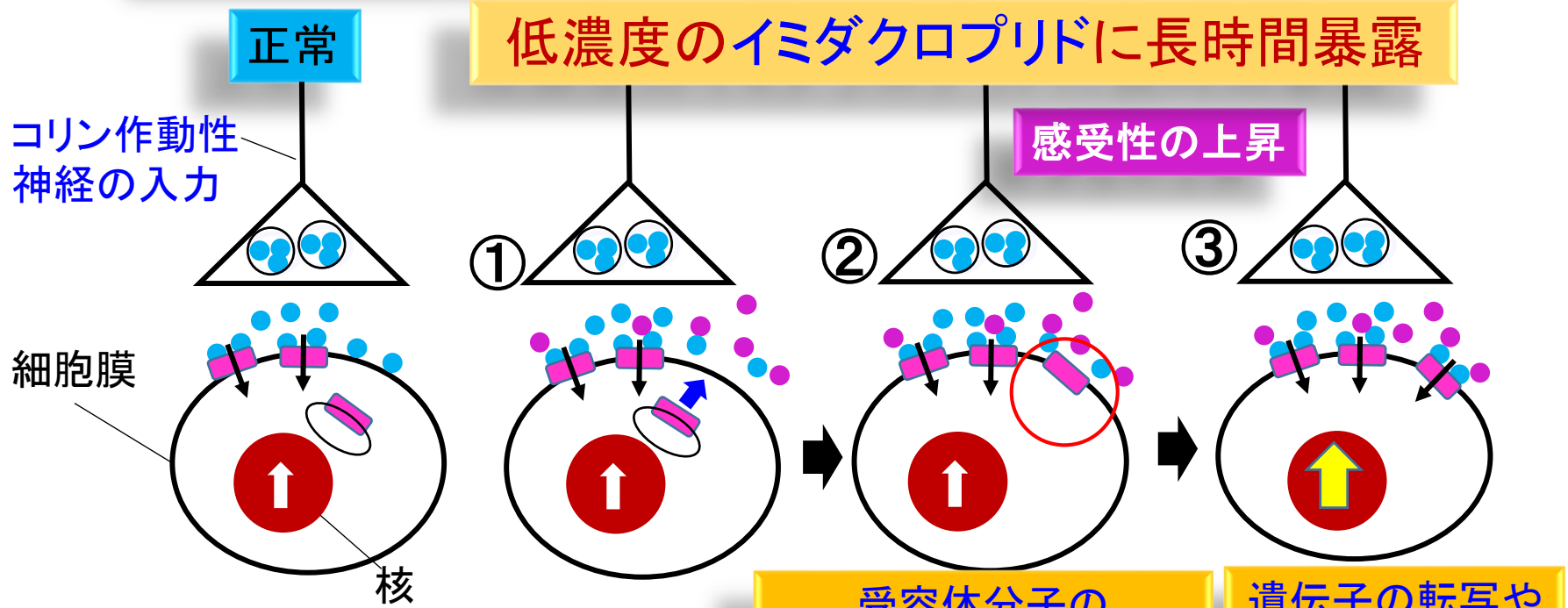


細胞外へ突出した受容体タンパク質の領域を認識する抗体で細胞膜に存在する受容体を染色後、蛍光顕微鏡で観察して定量化を行った。

スケール: 10 μm

C: コントロール(溶媒) ; NIC: 30 μMニコチン; IMI: 30 μMイミダクロプリド。

哺乳類の内分泌系細胞(副腎髄質細胞)における 低濃度イミダクロプリドの毒性発現メカニズム(モデル)



- : イミダクロプリド
- : 内在性アセチルコリン
- : ニコチン性アセチルコリン受容体
- : 細胞内のニコチン性アセチルコリン受容体
- : 細胞外から細胞内への陽イオン(Na⁺, Ca²⁺)の流入
- ↑ : チロシン水酸化酵素遺伝子の転写
- ↑ : チロシン水酸化酵素遺伝子の転写**増強**

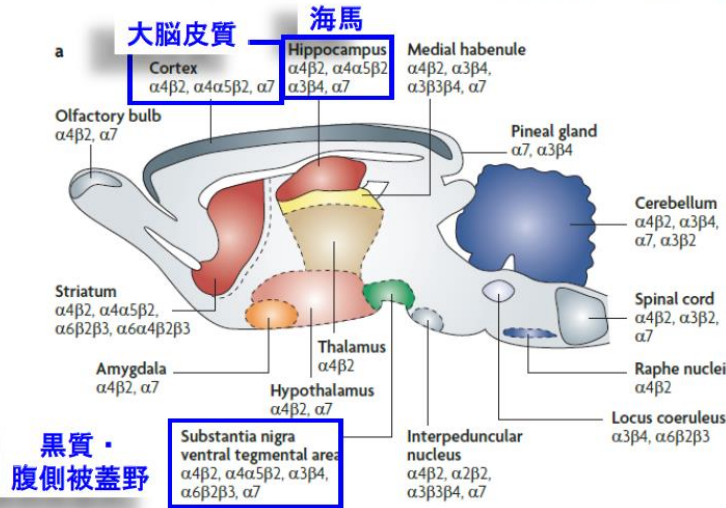
Summary & Conclusions

- IMIは、副腎髄質細胞を低濃度で長時間処置すると、ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 3\beta 4$)の部分作動薬として作用し、ニコチンのチロシン水酸化酵素 (TH)等の転写促進作用を増強し、アドレナリンの生合成・分泌活性を高めた。
- IMIは、細胞膜へのニコチン性アセチルコリン受容体の集積促進作用は、ニコチン程強くはないが、認められた。また、ニコチンと併用すると、ニコチンのニコチン性アセチルコリン受容体の集積促進作用を増強した。
- ◆ 本研究の結果から、低濃度IMIの長期暴露は、細胞膜におけるニコチン性アセチルコリン受容体の集積を促進し、薬剤感受性を上昇させ、哺乳類の副腎髄質細胞の機能を亢進させることが示唆された。

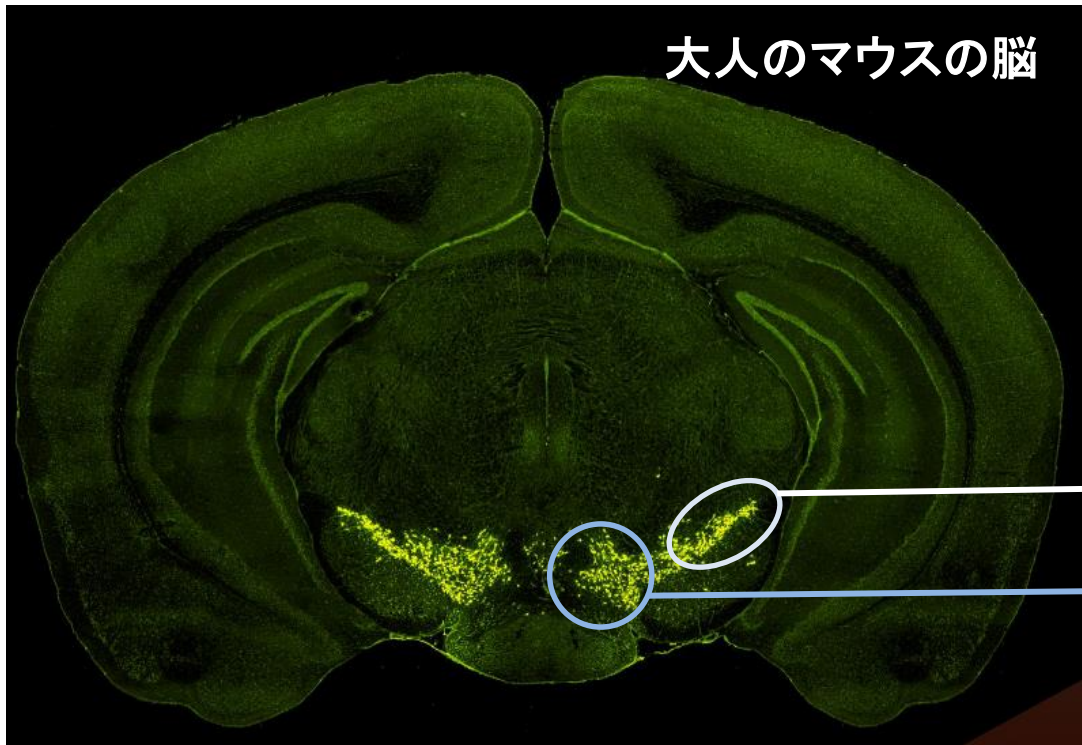
なお、本研究は一般社団法人アクト・ビヨンド・トラストの2018年度「ネオニコチノイド系農薬に関する企画」公募研究助成を受けた。

最新情報

哺乳類ニコチン性アセチルコリン受容体の脳内分布



- ◆ 私のlabでは、
大人のマウス脳でドパミン神経の恒常性維持に不可欠な調節機構を発見。
- ◆ これはヒトの脳にも存在。
- ◆ V-1と呼ばれるタンパク質がこの機構の重要な分子。
- ◆ この調節機構はニコチン性アセチルコリン受容体並びにグルタミン酸受容体のNMDA受容体とリンク。



意欲、動機付け、運動の始動

黒質緻密部ドパミン神経

腹側被蓋野ドパミン神経

