

学 位 論 文 要 旨

氏名 DAO VAN CUONG

題 目 : Study on effects and mechanisms of methylmercury toxicity on neuronal and endothelial cells
(神経および血管内皮細胞に対するメチル水銀毒性の影響と作用機序に関する研究)

論文要旨 :

The present thesis was designed to study the effects and mechanisms of methylmercury (MeHg) toxicity on neuronal and endothelial cells.

The first chapter report a study entitled “MARCKS is involved in MeHg-induced decrease in cell viability and nitric oxide production in EA.hy926 cells”. MeHg is a persistent environmental contaminant that has been reported worldwide. MeHg exposure has been reported to lead to increased risk of cardiovascular diseases; however, the mechanisms underlying the toxic effects of MeHg on the cardiovascular system have not been well elucidated. We have previously reported that mice exposed to MeHg had increased blood pressure along with impaired endothelium-dependent vasodilation. In this study, we investigated the toxic effects of MeHg on a human endothelial cell line, EA.hy926. Although it has been reported that the alteration in MARCKS expression or phosphorylation affects MeHg-induced neurotoxicity in neuroblastoma cells, the relationship between MeHg toxicity and MARCKS has not yet been determined in vascular endothelial cells. Therefore, in this study, we investigated the role of MARCKS in MeHg-induced toxicity in the EA.hy926 endothelial cell line. Cells exposed to MeHg (0.1–10 μ M) for 24 hr showed decreased cell viability in a dose-dependent manner. Treatment with submaximal concentrations of MeHg decreased cell migration in the wound healing assay, tube formation on Matrigel and spontaneous nitric oxide (NO) production of EA.hy926 cells. MeHg exposure also elicited a decrease in MARCKS expression and an increase in MARCKS phosphorylation. MARCKS knockdown or MARCKS overexpression in EA.hy926 cells altered not only cell functions, such as migration, tube formation and NO production, but also MeHg-induced decrease in cell viability and NO production. These results suggest the broad role played by MARCKS in endothelial cell functions and the involvement of MARCKS in MeHg-induced toxicity.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

In the second chapter, the author report a study entitled “MARCKS protein amount is differently regulated by calpain during toxic effects of methylmercury between SH-SY5Y and EA.hy926 cells”. We previously reported that amount of MARCKS protein in SH-SY5Y neuroblastoma and EA.hy926 vascular endothelial cell lines is decreased by treatment of MeHg, however, the mechanisms are not known. While, calpain, a Ca^{2+} -dependent protease, is suggested to be associated with the MeHg toxicity. Since MARCKS is known as a substrate of calpain, we investigated relationship between calpain activation and cleavage of MARCKS, and its role in MeHg toxicity. In SH-SY5Y cells, MeHg induced a decrease in cell viability accompanying calcium mobilization, calpain activation, and a decrease in MARKCS expression. However, pretreatment with calpain inhibitors attenuated the decrease in cell viability and MARCKS expression only induced by 1 μ M but not by 3 μ M MeHg. In cells with MARCKS-knockdown, calpain inhibitors failed to attenuate the decrease in cell viability by MeHg. In EA.hy926 cells, although MeHg caused calcium mobilization and a decrease in MARCKS expression, calpain activation was not observed. These results indicated that involvement of calpain in the regulation of MARCKS was dependent on the cell type and concentration of MeHg. In SH-SY5Y cells, calpain-mediated proteolysis of MARCKS was involved in cytotoxicity induced by low concentration of MeHg.

Together, the present thesis revealed 1) characteristics of MeHg toxicity on endothelial cells, 2) involvement of MARCKS on its toxicity, and 3) different toxic mechanism of MeHg between neuronal and endothelial cells. The results suggest the broad role of MARCKS in endothelial cell functions and show that MARCKS is involved in MeHg-induced toxicity in endothelial cells. The results also indicate that the participation of calpain in the regulation of MARCKS amounts is dependent on the cell type and concentration of MeHg. These findings will stimulate and support further progress in research on toxic mechanisms of MeHg in central nervous system and cardiovascular system.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Dao Van Cuong
審査委員	主査： 鹿児島大学 教授 宮本 篤
	副査： 鳥取大学 教授 太田 利男
	副査： 鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副査： 鹿児島大学 准教授 白石 光也
	副査： 鹿児島大学 准教授 田仲 哲也
題目	Study on effects and mechanisms of methylmercury toxicity on neuronal and endothelial cells (神経および血管内皮細胞に対するメチル水銀毒性の影響と作用機序に関する研究)
審査結果の要旨： 本論文は、メチル水銀 (MeHg) 毒性の神経および内皮細胞に及ぼす影響およびその作用機序を明らかにするために計画された。 第 1 章では、「MARCKS は EA.hy926 細胞で MeHg 誘導性の細胞生存率および一酸化窒素産生の低下に関与する」と題する研究を報告している。MeHg は世界中で報告されている持続性の環境汚染物質であり、MeHg の暴露は心臓血管疾患のリスク増加につながると報告されている。しかしながら、心血管系に対する MeHg の毒性作用の根底にある作用機序は、十分に解明されていない。私達はこれまでに、MeHg に曝露されたマウスは内皮依存性の血管拡張の障害とともに血圧が上昇することを報告している。この研究では、私達は、ヒト内皮細胞株である EA.hy926 に対する MeHg の毒性効果を調べた。MARCKS の発現またはリン酸化の変化が、神経芽腫細胞における MeHg 誘発性の神経毒性に影響することを報告されているが、MeHg 毒性と MARCKS との関係は、血管内皮細胞においてまだ明らかにされていなかった。したがって、本研究では、EA.hy926 内皮細胞株における MeHg 誘発毒性における MARCKS の役割を調べた。MeHg (0.1 - 10 μ M) に 24 時間曝露された細胞は、用量依存性に細胞生存率の低下を示した。MeHg の最大下濃度での処置は、創傷治癒アッセイにおける細胞移動、Matrigel 上の管形成および EA.hy926 細胞での自発的な一酸化窒素 (NO) 産生を減少させた。MeHg 暴露はまた、MARCKS 発現の減少および MARCKS リン酸化の増加を引き起した。EA.hy926 細胞における MARCKS ノックダウンまたは MARCKS 過剰発現は、遊走、管形成および NO 産生などの細胞機能を変化させるだけでなく、MeHg 誘導性の細胞生存率および NO 産生の低下を引き起した。これらの結果は、内皮細胞機能における MARCKS の広範な役割と、MeHg 誘発毒性に	

(別紙様式第 10 号)

における MARCKS の関与を示唆している。

第 2 章では、私達は、「MARCKS タンパク質量は、SH-SY5Y 細胞と EA.hy926 細胞でメチル水銀の毒性作用が引き起こされている間に、カルパインによる異なる調節を受けている」と題する研究を報告している。私達はこれまで、SH-SY5Y 神経芽細胞腫および EA.hy926 血管内皮細胞系で MARCKS タンパク質の量が MeHg の処置によって減少することを報告したが、その作用機序はまだ知られていない。一方、Ca²⁺依存性プロテアーゼであるカルパインは、MeHg 毒性と関連していることが示唆されている。MARCKS はカルパインの基質として知られているため、私達はカルパインの活性化と MARCKS の切断との関係、および MeHg 毒性におけるその役割を調べた。SH-SY5Y 細胞では、MeHg はカルシウム動員、カルパイン活性化を伴う細胞生存率の低下、および MARCKS 発現の低下を引き起こした。しかしながら、カルパイン阻害薬の前処置は、3 μM の MeHg ではなく 1 μM の MeHg で引き起こされる細胞生存率および MARCKS 発現の低下を減弱させた。MARCKS をノックダウンした細胞では、カルパイン阻害薬は MeHg による細胞生存率の低下を減弱させることはできなかった。EA.hy926 細胞では、MeHg がカルシウム動員を引き起こし、MARCKS 発現の低下を引き起こすが、カルパイン活性化は観察されなかった。これらの結果は、MARCKS の調節におけるカルパインの関与は、細胞型および MeHg の濃度に依存していること、また SH-SY5Y 細胞において、MARCKS のカルパイン媒介性のタンパク質分解は、低濃度の MeHg によって引き起こされる細胞毒性に関与していることが示された。

以上、本論文では 1) 内皮細胞に対する MeHg 毒性の特徴、2) MARCKS の毒性への関与、3) 神経細胞と内皮細胞間で MeHg の異なる毒性メカニズム、を明らかにした。これらの結果は、内皮細胞機能における MARCKS の広範な役割を示唆し、MARCKS が内皮細胞における MeHg が引き起こす毒性に関与することを示している。この結果はまた、MARCKS 量の調節におけるカルパインの関与が、細胞型および MeHg の濃度に依存することを示した。これらの所見は、中枢神経系および心血管系における MeHg の毒性発現機序に関する研究のさらなる進展を刺激し支持するものである。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分に値する内容であることを認める。