

## メチル水銀による末梢神経障害の分子・細胞的基盤

主任研究者 鍛冶 利幸（東京理科大学薬学部・環境健康学研究室・教授）

### 研究要旨

水俣病がハンター・ラッセル症候群といわれる中枢神経障害であることから、従前よりメチル水銀の毒性発現機構に関する研究は主に中枢神経を構成する cell type を対象に行われてきた。しかしながら、水俣病の初期で認められる末梢神経障害、特に感覚神経優位な傷害についての研究は極めて不十分な状態にある。

これまでに我々は、「重金属等による健康影響に関する総合的研究(2016-2018年度)」の支援を得て「メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する研究」を実施し、ラット後根神経節を材料として、メチル水銀の感覚神経への毒性発現にTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルカスケードの活性化が関与し得ること、その要因あるいは結果として、マクロファージ集積、ミクログリアの活性化、シュワン細胞の増殖があることを見出した。

本研究はこれまでの研究成果を基盤とし、TNF- $\alpha$ およびTLRシグナル経路の関与についてさらなる解析を行う。また、マクロファージやミクログリアの集積/活性化とメチル水銀毒性の関連性について明らかにする。さらに末梢感覚神経が関与する各種感覚モダリティのメチル水銀毒性に対する脆弱性について行動学的、組織学的な解析を行う。加えて、妊娠時のメチル水銀曝露による末梢感覚神経毒性についても検討を行う。これらの研究によりメチル水銀による末梢神経障害の分子・細胞的基盤を包括的に解析し、水俣病における末梢神経障害の理解に貢献するものである。

キーワード：末梢神経障害，感覚神経，前角神経，後根神経節（DRG），TNF- $\alpha$

### 研究者協力者

篠田 陽・東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室（准教授）

吉田 映子・東京理科大学薬学部環境健康学研究室（講師）

### I 研究目的

水俣病の初期症状として出現する四肢末端の感覚障害は、中枢性（大脳皮質中心後回）病変によるものと、末梢性（末梢感覚神経）病変によるものとが考えられている。水俣病患者末梢神経の死後病理解析において、運動神経は傷害がなく、感覚神経のみ顕著に傷害されること、その傷害は軸索変性が先行しており髄鞘には変化が見られないことが報告されている。このように、病理組織学的な感覚神経病変は示されているが、末梢神経を構成する神経のなかでも感覚神経のみが傷害される分子的基盤に関する報告例は少なく、有力な仮説もない。

我々はこれまでに、後肢交差を示すメチル水銀中毒ラット（水俣病モデルラット）後根神経節（DRG）の遺伝子発現解析および組織学的解析において、メチル水銀による感覚神経特異的な毒性発現にTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルカスケードの活性化が関与し得ること<sup>1)</sup>、その要因あるいは結果としてマクロファージ集積、ミクログリアの活性化、シュワン細胞の増殖があることを見出した<sup>2)</sup>。さらにDRG神経細胞と脊髄前角神経細胞（AHC）の初代培養による比較において、メチル水銀によるDRG特異的な傷害がメチル水銀の細胞内蓄積量に依存すること、そしてこれはDRGにおけるメチル水銀の細胞内輸送体LAT-1の発現が恒常的に高いことに加え、メチル水銀の細胞外排泄に関わる輸送体MRP-2の発現が低いことに起因することが示され、DRG神経細胞がメチル水銀を蓄積しやすい特性を有することを明らかにした。

本研究の目的はこれらの研究を踏まえ、第一にメチル水銀による感覚神経への毒性発現に対するTNF- $\alpha$ およびTLRシグナル、およびそれらシグナル経路に寄与するマクロファージやミクログリアの集積/活性化の関与についてより詳細なメカニズムを解明する（令和元年）。第二に、それらの得られた知見を活用し、臨床的にも不明な点が多いメチル水銀による種々感覚モダリティの感受性の差異を明らかにする（令和2年）。第三に、妊娠および未妊娠の動物母体におけるメチル水銀の毒性発現について、特に感覚神経に対する毒性の差異とそのメカニズムを明らかにする（令和3年）。

以上より、本年度は第一の目的、メチル水銀による感覚神経への毒性発現に対するTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルの関与を明らかにするため、TNF- $\alpha$ 欠損マウスを用いてメチル水銀の毒性評価を実施した。また、来年度以降実施予定であった第二の目的である水俣病モデルラットにおける感覚モダリティ評価に関する予備的検討も実施した。

## II 研究方法

### 方法 1（DRG/AHC 初代培養細胞およびシュワン細胞を用いた MeHg の毒性評価）：

ラットシュワン細胞は ScienCell Research Lab より購入した。DRG 神経細胞（感覚神経）および AHC（運動神経）は、3~4 週齢の雄 Wistar Rat の胸椎から仙椎を摘出し、各神経細胞を分離して得た。神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し<sup>3,4)</sup>、DRG 細胞は 7 日間、AHC は 14 日間、10% FBS-DMEM にて培養した後、実験に使用した。メチル水銀は 1% BSA-DMEM を用いて 0.5, 1 および 3  $\mu$ M に調製し曝露した。LAT-1 の選択的阻害剤 JPH203（0.5  $\mu$ M および 1  $\mu$ M）を 1 時間前処理した後、メチル水銀（0.25, 0.5, 1, 3, 5  $\mu$ M）を 24 時間曝露し、形態学的観察および Cell Counting Kit-8 (Dojindo) にて細胞生存率を評価した。

### 方法 2（TNF $\alpha$ 欠損マウスの毒性評価）：

三協ラボサービス株式会社より購入した C57BL/6J 野生型マウス（6~10 週齢雄，25~30 週齢雄または雌）もしくは TNF $\alpha$  欠損マウス（野生型に対応する週齢）に、2 mg/mL に調製した塩化メチル水銀水溶液を 15 mg/kg/day で 5 日間投与 2 日間未投与のサイクルで 2 週間経口投与した。コントロールは体重あたり同量の PBS を投与した。

投与開始直後より体重測定、生存率の確認を行うとともに、マウスを固定し後肢の踵間

の距離を測定し評価した。

### 方法 3 (ラットを用いた種々感覚刺激に対する応答特性評価) :

東京実験動物株式会社より購入した Wistar ラット (9 週齢雄) に、2 mg/mL に調製した塩化メチル水銀水溶液を 6.7 mg/kg/day で 5 日間投与 2 日間未投与のサイクルで 2 週間経口投与した。コントロールは体重あたり同量の水を投与した。投与開始直後より体重測定、後肢交差判定、生存率の確認を行うとともに、以下それぞれの手法を用いて感覚刺激に対する応答特性を、1 日 1 試験、投与開始後 70 日に渡って検証した。

#### 【冷覚試験】

冷覚試験は tail dipping test を用いて行なった。4 度の水にラットの尾の付け根から 5 cm より先の部分を浸し、尾を跳ね上げるまでの潜時を測定した。

#### 【温覚試験】

温覚試験は tail dipping test および tail flick test を用いて行なった。Tail dipping test は 50 度のお湯にラットの尾の付け根から 5 cm より先の部分を浸し、尾を跳ね上げるまでの潜時を測定した。Tail flick test はラットの尾の付け根から 5 cm の部位に、8 cm の高さからヒートガンで熱風を吹きつけ、尾を跳ね除けるまでの潜時を測定した。

#### 【痛覚試験】

痛覚試験は foot shock test を用いて行なった。床に刺激電極金網を張り巡らせた刺激箱にラットを入れ、刺激電流を 0.1 mA から順に増加させ、ラットが驚愕応答をした際の電流値を測定した。

#### 【圧覚試験】

圧覚試験は von Frey test を用いて行なった。異なる太さのナイロンフィラメントを細いものから太いものへと順番に後肢に押し付け、後肢を退避させた際のフィラメント太さに対する荷重量を測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は人権の保護やそれに関する法令の遵守を必要とする研究には該当しない。

動物実験については東京理科大学の動物委員会 (承認番号 Y19030 および承認番号 Y19031) および遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号 1882) で承認されたものであり、承認された内容に沿って適切に実施した。また、研究協力者についても所属する東京薬科大学の動物実験委員会により承認された実験方法により (P19-02)、法令および動物実験倫理規定に沿って研究を行った。

メチル水銀を含む有害な化学物質を用いる実験に関しては、安全に留意し、廃棄に関しては学内外の環境汚染防止ならびに生活環境の保全を図るために、東京理科大学環境安全センターおよび東京薬科大学環境安全規定が定める廃棄手順に従い、適切に廃棄した。

### III 研究結果

前年度までの研究成果において、メチル水銀によるDRG特異的な傷害はメチル水銀の細胞内輸送体LAT-1の発現に依存することが示されたことから、本年度はLAT-1特異的阻害剤JPH203を用いて、メチル水銀によるDRG傷害に対する阻害剤の効果を検討した。その結果、メチル水銀によるDRGの細胞傷害がJPH203の処理濃度依存的に回復する傾向が認められた。

これまでに我々は*in vivo*および*in vitro*実験系において、メチル水銀による感覚神経特異的な毒性発現にTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルカスケードの活性化が関与し得ることを見出している。そこで、まずメチル水銀の毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割について検討するため、野生型マウス(雄)およびTNF- $\alpha$ 欠損マウス(雄)に対するメチル水銀毒性発現の差異について毒性評価を行った。その結果、野生型およびTNF- $\alpha$ 欠損マウスにメチル水銀を投与しても、マウスの生存率および体重減少の変化に有意な差は認められなかった。また、各臓器における水銀蓄積量を検討したところ、肝臓、腎臓、心臓、DRG、大脳および小脳とどの臓器を比較しても野生型およびTNF- $\alpha$ 欠損マウスにおける水銀蓄積量に顕著な差は認められなかった。しかしながら、野生型マウスにおいては投与後8日目に顕著な後肢伸長症状が認められたが、TNF- $\alpha$ 欠損マウスにおいてはそのような現象は認められなかった。さらに、後肢間の距離(cm)を比較すると、投与後9日目ではTNF- $\alpha$ 欠損マウスと比較して野生型マウスの後肢間の距離が優位に短縮していた。この後肢伸長症状の出現率は野生型マウスでは投与後6日目から8日かけて50%に上昇し、投与後10日目では出現率が70%であった。一方、TNF- $\alpha$ 欠損マウスの後肢伸長症状の出現率は投与後8日目から10日かけて20%の出現率であり、TNF- $\alpha$ 欠損マウスにおいてはメチル水銀による後肢伸長症状の出現の遅延が認められた。さらに、野生型マウスおよびTNF- $\alpha$ 欠損マウスの雌におけるメチル水銀感受性を評価したところ、TNF- $\alpha$ 欠損マウスの雌は、野生型の雌に比べメチル水銀感受性が低下する傾向が得られた。また、後肢伸長症状の発症時期や発生率においては雄と同様の傾向が認められ、TNF- $\alpha$ 欠損マウスの雌においてメチル水銀による後肢伸長症状の出現の遅延が認められた。

ラットを用いた感覚刺激応答特性については、メチル水銀投与群において、体重は投与開始10日目より有意な減少を示し、生存率は投与開始40日目に60%に達した。後肢交差は投与開始2週目ごろから徐々にスコアが上昇し、4週目ごろにピークに達したのち、7週目ごろより回復傾向が見られた。感覚刺激についての応答は、冷覚が投与開始2週目ごろに鈍麻し、5週目に回復した。温覚も2週目に鈍麻が確認され、5週目に回復した。痛覚は2週目後半に鈍麻が確認され、6週目ごろに回復した。圧覚は2週目に鈍麻が確認されたが一度4週目に回復し、7週目から8週目に再度鈍麻、その後回復した。

### IV 考察 および V 結論

#### 1) メチル水銀によるDRG特異的な傷害に対するLAT-1の関与

メチル水銀の細胞内輸送体LAT1の選択的阻害剤JPH203を前処理すると、メチル水銀によ

るDRGの細胞傷害性が軽減される傾向であったことから、DRGにおける恒常的なLAT-1の発現が高いためにメチル水銀を取り込み易い特性を有することが、メチル水銀により感覚神経優位な傷害を引き起こされるメカニズムの1つと考えられる。現在より詳細に形態学的観察および毒性試験による評価を実施すると共に、DRGへのLAT-1干渉RNAの導入によるメチル水銀細胞傷害性の評価も検討するため条件検討を行っているところである。

さらにJPH203は新規抗がん剤として注目され、現在臨床試験中であることから、本阻害剤がメチル水銀による感覚神経特異的な傷害に対し有効であるか検討するため、ラットおよびマウスを用いた行動学的解析（主に後肢交差または後肢伸長への効果）および病理組織学的解析を今後実施する予定である。

## 2) メチル水銀による毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割

メチル水銀の毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割について検討するため、野生型およびTNF- $\alpha$ 欠損マウスに対するメチル水銀毒性発現の差異について毒性評価を行ったところ、生存率や体重低下、および各臓器における水銀蓄積量に顕著な差は認められなかったが、TNF- $\alpha$ 欠損マウスは野生型と比較しメチル水銀による後肢伸長症状に遅延が認められたことから、少なくともTNF- $\alpha$ 欠損がメチル水銀による後肢伸長症状の出現に関与する可能性が示唆された。

また当研究室の先行研究において、メチル水銀に刺激されたマクロファージからTNF- $\alpha$ の分泌が促進されることを見出しており、水俣病モデルラットのDRGおよび感覚神経において観察されたマクロファージの集積やミクログリアの活性化に、メチル水銀刺激によるTNF- $\alpha$ の分泌促進が関与する可能性が示唆される。現在マクロファージの集積やミクログリアの活性化とDRG神経細胞障害の関連性についてその因果関係を探索している。

## 3) ラットを用いた種々感覚刺激に対する応答特性評価

投与開始からの体重減少や生存率の低下、後肢交差の惹起などにより、メチル水銀の毒性が顕著に発現していることが確認された。各種感覚モダリティの刺激に対する応答特性を評価したところ、予備的な結果ではあるものの、個々の感覚モダリティに対してメチル水銀の毒性発現に特異性がある可能性が示唆された。また、投与終了後長期間経過すると、各種感覚応答について回復傾向が観察された。我々のこれまでの研究により、投与開始14日目のDRGおよび感覚神経繊維において、既に顕著な神経細胞と軸索の脱落が観察されている。通常神経細胞は増殖しないと考えられるため、今回確認された各種感覚モダリティの回復傾向がどのようなメカニズムによりもたらされるかについては興味深い。

## VI 次年度以降の計画

### メチル水銀による毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割（1～2年目）

本年度の研究成果については先に述べた通りであるが、しかしながら現時点ではTNF- $\alpha$ 欠損マウスにおける後肢伸長症状の遅延が中枢由来か末梢由来か不明である。また、メチル

水銀による感覚神経特異的な傷害にTNF- $\alpha$ が関与するかの解決には至っていない。今後、TNF- $\alpha$ 欠損マウスにおける後肢伸長症状の遅延に関して大脳、小脳およびDRG（感覚神経および運動神経含む）の病理組織学検討を実施し、特にDRGや感覚神経におけるメチル水銀傷害について野生型マウスと比較する。さらにはメチル水銀を投与した野生型マウスにおいて発現した後肢伸長症状に対して、抗TNF- $\alpha$ 抗体インフリキシマブによる効果が認められるかについて検討する。

また、水俣病モデルラットのDRGおよび感覚神経において観察されたマクロファージの集積やミクログリアの活性化、シュワン細胞の増殖にTNF- $\alpha$ が関与するかについても同様に病理組織学的検討を行い、これらの関連性について明らかにする。またこれら組織学的解析結果とDRG神経細胞死の因果関係を明らかにする目的で、ミクログリア/マクロファージ活性化抑制剤であるミノサイクリン投与下におけるメチル水銀毒性について、ラットDRGを用いた組織学的な検討を行う。

同様にTLR経路の活性化はTNF- $\alpha$ などの種々の炎症性サイトカインの産生に繋がることから、メチル水銀による感覚神経優位な毒性発現に対するTLR経路の検討を行う。本検討は主にマクロファージとDRG、AHC神経細胞およびシュワン細胞の初代培養を用いてメチル水銀によるTLR経路の活性化を比較する。

#### 種々感覚モダリティのメチル水銀感受性の差異（2年目～）

個々の感覚モダリティに対するメチル水銀の毒性発現特異性をさらに詳細に明らかにする目的で、感覚応答試験をより高頻度で行うことで、感覚鈍麻およびその回復のタイミングについて、時間分解能を高めた解析を計画している。また、各種感覚モダリティのメチル水銀感受性を組織学的に明らかにする目的で、種々感覚モダリティを担っているDRG神経細胞を免疫組織化学的に同定し、メチル水銀への感受性について評価を行う予定である。さらに、感覚鈍麻の回復傾向がどのようなメカニズムでなされているかを調査するために、脳および坐骨神経標本を免疫組織化学により染色し、その原因を探る。

#### この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) \*Shinoda Y, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, \*Kaji T, \*Fujiwara Y. *J. Toxicol. Sci.* (2019) 44(8) 549-558. Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats.
- 2) \*Shinoda Y, Ehara S, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, \*Kaji T, \*Fujiwara Y. *J. Toxicol. Sci.* (2019) 44(3), 191-199. Methylmercury-induced neural degeneration in rat dorsal root ganglion is associated with the accumulation of microglia/macrophages and the proliferation of Schwann cells.

引用文献

- 1) 米沢猛. 組織培養. 中井, 岡本編. 朝倉書店. 1964; 392.
- 2) Braschler UF *et al.* Journal of Neuroscience Methods, 1989; 29: 121-129

# The molecular and pathological mechanisms of methylmercury-induced sensory disturbance in rodent

Toshiyuki Kaji\*1, Eiko Yoshida\*1, Yo Shinoda\*2

\*1 Department of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science and

\*2 Department of Environmental Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Keywords: Dorsal root ganglion (DRG); Methylmercury; Peripheral nervous system; Sensory neuron;

## Abstract

Methylmercury (MeHg) is an environmental pollutant that induces serious neurological damage in the brain of humans and animals, as is observed in patients with Minamata disease. The important characteristics of MeHg-induced pathological changes in peripheral nerves appear to be unique; the sensory neurons and nerves, not motor neurons and nerves, are selectively damaged with regeneration in chronic intoxication of MeHg. In the previous study, it found that selective damage of MeHg to sensory neurons were due to the inflammatory response to MeHg; microarray data showed that TNF- $\alpha$  and TLR pathways were involved. However, the mechanism of MeHg-induced sensory neuron-specific cytotoxicity has been incompletely known. Furthermore, pathological time course of the degeneration of sensory neurons that assume each sensory modality has also been not fully investigated. The purpose of this study is to investigate the molecular and pathological mechanisms underlying the toxic effects of MeHg on the sensory neurons in dorsal root ganglion.

To investigate whether the TNF- $\alpha$  signaling pathway is essential for the neurotoxicity of MeHg in DRG, we used TNF- $\alpha$  deficient (KO) mice. Oral administration of MeHg to KO mice showed no significant difference in survival and weight loss compared with wild-type (WT) mice. However, MeHg increased the induction rate of hind-limb flaccidity in WT mice, while the administration of MeHg to KO mice reduced the induction rate of hind-limb flaccidity. These results suggest that TNF- $\alpha$  pathway may be involved in appearance of hind limb extension symptoms caused by MeHg.

Next we performed sensory response test in MeHg administrated Wistar rat to elucidate the sensitivity of each sensory neuron to MeHg. Tail dipping test, tail flick test, foot shock test, and



von Frey test were introduced for 70 days to analyze the time course of cold, heat, pain, and touch senses, respectively. Each modality showed significant hypoesthesia, but their timing of the expression and the recovery were different each other. It may be explained by the different sensitivity of each sensory neuron to MeHg.

Further investigations should be performed to clarify the molecular and pathological mechanisms of MeHg-induced peripheral sensory dysfunction, however, inflammatory responses must be involved in the MeHg toxicity in sensory neurons and these neurons may have their own sensitivity to MeH.