

メチル水銀によるTNF受容体3を介した脳神経細胞死誘導機構

主任研究者 黄 基旭（東北医科薬科大学薬学部教授）

研究要旨

我々はこれまでに、メチル水銀はミクログリアにおいてオンコスタチンM（OSM: IL-6分子種の一員）を発現誘導し、細胞外へ放出されたOSMがTNF受容体3（TNFR3）を介して神経細胞死を誘導する可能性を見出した。また、メチル水銀は転写因子のSTAT3およびcJun（AP-1）を活性化させることでOSMを発現誘導することや、両因子の活性化にJAK1およびASK1/JNK経路が関与することを報告した。そこで本年度は、メチル水銀によるOSMの発現誘導およびTNFR3を介した細胞死誘導に関わる分子機構を検討するとともに、マウスでのメチル水銀による脳神経障害へのTNFR3の関与を検討した。

JAK1およびASK1は細胞外リガンドの細胞膜受容体との結合によって活性化される。そこで、メチル水銀処理によって細胞外へ放出される因子を含む調製培地を作製したが、本培地で培養したBV2細胞（マウス由来ミクログリア細胞株）ではOSMの発現誘導が認められなかった。また、ASK1の活性化に関わる既知の経路もメチル水銀によるOSMの発現誘導に関与しないことが示唆された。一方、ミクログリアの活性化に関わるROCK1の発現抑制はメチル水銀によるOSMの発現誘導およびSTAT3のリン酸化とともに低下させた。また、これらの低下およびcaspase-3による切断型ROCK1（活性化体）の生成は、caspase-3を発現抑制することによってほとんど認められなくなった。これらのことから、メチル水銀はcaspase-3によるROCK1の活性化を介してSTAT3のリン酸化を促進させることでOSMを発現誘導していることが示唆された。次にメチル水銀を自由飲水で8週間摂取した野生型マウス的大脑を免疫染色で調べた結果、大腦皮質での神経軸索の形成および伸長が抑制されていたのに対し、TNFR3欠損マウスではその傷害が減弱していた。このことは、TNFR3がメチル水銀によるマウス的大脑皮質での神経障害に関与することを示唆している。さらにTNFR3結合蛋白質として同定したRPSAの発現抑制は、メチル水銀によるcaspase-3の活性化を低下させ、この活性化は両因子を同時に抑制してもさらに低下されることなく単独発現抑制と同程度であった。このことは、TNFR3がRPSAと複合体を形成することでメチル水銀によるアポトーシス誘導を促進していることを示唆している。

以上のことから、メチル水銀はcaspase-3によるROCK1の活性化を介してSTAT3リン酸化を促進することでOSMを発現誘導することと、細胞外OSMと結合するTNFR3はRPSAと複合体を形成することでメチル水銀による大腦皮質での神経障害に関与する可能性が個体レベルで示唆された。

キーワード：メチル水銀、オンコスタチンM（OSM）、TNFR3、STAT3、ROCK1、Caspase-3

研究者協力者

進藤 佐和子（東北医科薬科大学薬学部助教）

I 研究目的

メチル水銀毒性に対する感受性には遺伝的な個体差があると考えられるが、感受性決

定の分子機構はほとんど解明されていない。我々は、メチル水銀を投与したマウス脳中のミクログリアにおいてオンコスタチンM (OSM; IL-6分子種の一員) が発現誘導されることを報告した。また、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上に存在する可能性のあるTNF受容体3 (TNFR3) に結合することで細胞死を誘導することも見出している。さらに、OSMやTNFR3に対する中和抗体をマウス脳組織スライスに添加することによりメチル水銀による神経細胞死が抑制されたことから、OSMとTNFR3はメチル水銀による脳神経傷害に関与している可能性が強く示唆されている。昨年度のBV2細胞 (マウス由来ミクログリア細胞株) を用いた検討では、転写因子のSTAT3およびcJun (AP-1) が共役してメチル水銀によるOSMの発現誘導に関わることと、これらの活性化にそれぞれの上流キナーゼであるJAK1およびASK1/JNKが関与することを報告した。そこで本年度は、メチル水銀によるOSM発現誘導機構の全容解明を目指して、JAK1およびASK1/JNK経路の上流因子について検討した。また個体でのメチル水銀による脳神経障害へのTNFR3の関与、およびC17.2細胞 (マウス神経幹細胞株) を用いてメチル水銀によるTNFR3を介した神経細胞死誘導機構について検討した。

II 研究方法

1. メチル水銀で前処理した調製培地の作製

BV2細胞を 2×10^5 cells/0.9 mL/wellとなるように12-well plateに播種し、24時間後に100 μ Lのメチル水銀溶液を終濃度20 μ Mとなるように添加し2時間後、メチル水銀が含有する培地を取り除き、1 \times PBSで洗浄後、新鮮な培地を1 mL加え、さらに2時間培養し、培地を回収した。この回収した培地を調製培地とした。

2. BV2細胞での遺伝子発現抑制およびOSMの発現誘導

BV2細胞を 1×10^5 cells/wellになるように12-well plateに播種し、24時間培養した。その後、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher) 試薬を用いてROCK1およびcaspase-3に対するsiRNAを単独または二重に導入し、さらに24時間培養した後に100 μ Lの塩化メチル水銀 (最終濃度20 μ M) で処理した。培養終了後Isogen II (Nippon Gene) 試薬により総RNAを回収し、逆転写反応後、qPCRによりOSM mRNAレベルを検討した。なお、OSM mRNAレベルは各サンプル中のGAPDH mRNAレベルで補正した。

3. 細胞抽出物を用いたウエスタンブロット

BV2細胞を 2×10^5 cells/0.9 mL/wellとなるように12-well plateに播種して24時間後に、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher) 試薬を用いてROCK1またはcaspase-3に対するsiRNAを導入し、さらに24時間培養した後に100 μ Lの塩化メチル水銀 (最終濃度20 μ M) で処理した。2時間まで培養した後、培地を完全に除去し、あらかじめ氷冷したPBSで1回洗浄した。各wellに150 μ Lの2% SDS bufferを加え、ピペティングで可溶化し、95°Cで10分加熱することによって粘性を除去して得られた細胞抽出物をSDS-PAGEによって分離した後にそれぞれの蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

4. 各種プラスミドの作製およびC17.2細胞への導入

C17.2細胞から調製したcDNA鋳型として各種のプライマーおよびPrimeSTAR HSを用いてPCR反応を行い、それぞれのC末端にFLAGタグ配列を融合した塩基配列を増幅した。その後pcDNA3.1(+)をBamHIおよびEcoRIを用いて切断し、In-fusion HD Cloning Kit

を用いて PCR 断片を導入した。プラスミドは大腸菌 (DH5 α 株) に導入し、NucleoBond Xtra Midi により精製した。RPSA は精製後に一塩基の欠損が認められたため、作製したプラスミドを鋳型として KOD-Plus-Neo (TOYOBO) および各種のプライマーを用いて Inverse PCR を行い、欠損していた塩基を導入した。その後 KOD-plus-mutagenesis kit を用いてライゲーション反応を行い、上記と同様にプラスミドを精製した。C17.2 細胞 (1.6×10^5 cells/1.8 mL/well) を 6 well plate に播種し、37°C、5% CO₂、95%室内空気下で 24 時間培養した。その後 DNA transfection complex (plasmid DNA 3 μ g、PEI 10 μ g、Opti-MEM を合計 200 μ L になるよう混和し、室温で 15 分間静置したもの) を添加し、6 時間培養した後 transfection complex を含まない培地に交換し、さらに 18 時間培養した。

5. 蛍光染色

雄性マウスから脳を摘出し、10%ホルマリンで固定した後パラフィンで包埋した。その後厚さ 4 μ m の切片を作製し、蛍光染色に用いた。マウスパラフィン切片は xylene \times 2 回、100% EtOH \times 2 回、95% EtOH \times 2 回、70% EtOH \times 1 回で 5 分間から 3 分間浸して脱パラフィン処理を行った後、1 \times Antigen Decloaker (Biocare Medical、BRR910M) に浸して抗原賦活化装置 (Biocare Medical、DC2012-UPT) で 110°C、3 分間処理して抗原を賦活化した。室温に戻して精製水で置換した後、PBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash し、非特異的の反応を抑制するために、ブロッキング液 (0.4% triton X-100/PBS、1% bovine serum albumin、4% normal goat serum) を加え、室温で 60 分間反応させた。一次抗体は、抗体希釈液 (DAKO、S3022) で希釈し、4°Cで一晩反応させた。TTBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、二次抗体は 500 倍希釈した goat anti-rabbit IgG H&L、Alexa Fluor 488 (Invitrogen、A-11008) を用いて遮光下室温で 3 時間反応させた。PBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、蛍光染色用封入剤 (Vector Laboratories、H-1500) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss、LSM900) で観察した。

6. 免疫染色

上記の蛍光染色と同様に脱パラフィン処理および抗原賦活化を行った。室温に戻して精製水で置換した後、3% hydrogen peroxide/PBS に室温で 15 分間浸して内因性ペルオキシダーゼを除去した。TTBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、非特異的の反応を抑制するために、1.5% normal serum、goat/PBS または MOM specific IgG blocking reagent (Vector Laboratories、PK-6101、PK2200) を加え、室温で 60 分間反応させた。一次抗体は、1.5% normal serum、goat/PBS または MOM diluent を溶媒とし、一次抗体を 2000 倍で希釈し、4°Cで一晩反応させた。TTBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、二次抗体は 200 倍希釈した biotinylated anti-rabbit IgG または biotinylated anti-mouse IgG を用いて室温で 15 分間反応させた。TTBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、PBS で 50 倍希釈した ExtrAvidin peroxidase (Sigma-Aldrich、E2886) で室温 20 分間反応させた。TTBS で室温 5 分間 \times 2 回で wash 後、DAB Chromagen (DAKO、K3467) で 1 分から 4 分間様子を見ながら発色させ、直ちに流水の精製水で DAB を除いた。Modified Harris Hematoxylin (Sigma-Aldrich、HHS32) で 30 秒間浸して対比染色を行い、TTBS で室温 1 分間 wash した。その後、70% EtOH \times 1 回、95% EtOH \times 2 回、100% EtOH \times 2 回の順番で各 3 分間脱水処理を行い、xylene で 15 分間透徹し、Permount™ (Fisher Scientific、SP15-500) で封入して顕微鏡 (Olympus、CX43) で検鏡した。なお、本検討では一次抗体として市販されている anti-TNFR3 抗体の 6 種 (Abcam、ab123606 ; Invitrogen、PA5-75283 ; Proteintech、20331-1-AP ; Bioss、BS-

6917R ; Santa Cruz、sc-398929 ; LSBio、LS-C41113) を用いた。

(倫理面への配慮)

培養細胞の遺伝子組み換え体を用いた研究は、東北医科薬科大学遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た研究の一環として実施したものであり、遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、P2 指定実験室で作業を行った。動物実験についても、東北医科薬科大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北医科薬科大学における動物実験等に関する規程」に従って実施した。

III 研究結果と考察

(1) ミクログリアでのメチル水銀によるOSMの発現誘導機構

前述のように、メチル水銀はJAK1およびASK1/JNK経路を介してそれぞれSTAT3およびcJunを活性化させることでOSMを発現誘導することを見出した。両経路はリガンドが細胞膜上に存在する受容体の細胞外ドメインに結合すると活性化される。そこでまず、メチル水銀処理によって細胞外へ放出される因子を含む調製培地を作製し、本培地で新たに用意したBV2細胞を培養したがOSMの発現誘導は認められなかった。また、ASK1の活性化には、酸化ストレスや小胞体ストレス、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMK II) が関与する。しかし、抗酸化剤で前処理してもメチル水銀によるOSMの発現誘導は依然として認められ、また、本誘導の条件下においてCaMK IIの活性体であるリン酸化CaMK IIや小胞体ストレスマーカー (BiPやCHOP) の量が増加することも認められなかった。これらのことから、細胞外リガンドによるJAK1およびASK1/JNKの活性化は、メチル水銀によるOSMの発現誘導に関与しないことが示唆された。

セリンスレオニンキナーゼのROCK1はミクログリアの活性化に関与するとの報告がある。そこで、ROCK1の発現をsiRNA導入により抑制した結果、メチル水銀によるSTAT3のリン酸化およびOSMの発現誘導がともに低下した。一方、メチル水銀によるcJunのリン酸化はROCK1を発現抑制しても依然として認められた。ROCK1のC末端には自身の活性を抑制する領域が存在しており、アスパラギン酸特異的システイン依存性プロテアーゼであるcaspase-3は本領域を切断し除去することでROCK1を活性化する。メチル水銀によってOSMが発現誘導される際にcaspase-3の活性化が認められ、また全長型ROCK1量の減少に伴う切断型ROCK1量の増加も観察された。そこで、caspase-3を発現抑制した結果、メチル水銀による切断型ROCK1の生成およびOSMの発現誘導がともに低下した。これらのことから、メチル水銀はcaspase-3によるROCK1の活性化を介してSTAT3のリン酸化を促進させることでOSMを発現誘導していることが示唆された。一方、caspase-3はアポトーシス実行因子でもあるためBV2細胞をメチル水銀で経時的に処理した結果、OSMの発現誘導は2時間後に最大値を示したが、細胞死は3時間後にわずかに認められ、6時間後の生存率は約70%であった。このことから、caspase-3を介したメチル水銀によるOSMの発現誘導は細胞死に先行していることが示された。最後に、塩化鉛や塩化アルミニウム、トリブチルスズがOSM mRNA量に与える影響をBV2細胞で検討した。その結果、これらの金属類で細胞死が誘導される濃度まで処理してもOSMの発現誘導はほとんど認められなかった。このことは、メチル水銀はある程度選択的にOSMを発現誘導していることを示唆している。

(2) メチル水銀による脳神経損傷におけるOSMとTNFR3の関係

代表研究者の所属先変更により繁殖が遅延されていたTNFR3欠損マウスを用いて、メチル水銀による脳神経障害へのTNFR3の関与について検討した。まず、野生型マウス(C57BL/6Ncr)およびTNFR3欠損マウス(コントロール群6匹、メチル水銀投与群12匹)に40 ppmの塩化メチル水銀を含む飲水を8週間自由摂取させた。メチル水銀投与終了時の生存率は、野生型マウスが100%であったのに対し、TNFR3欠損マウスは50%程度まで低下した。なお、生存していたTNFR3欠損マウスを解剖すると肝臓や脾臓などが野生型マウスに比べて肥大していることが観察された。一方、両マウスの大脳中にはほぼ同量のメチル水銀が蓄積していた。先行研究により、メチル水銀を投与したマウス脳では主に大脳皮質や線条体などが傷害されることが知られている。そこで、大脳皮質や線条体付近の神経細胞をMAP2(細胞体と樹状突起、神経軸索のマーカー)およびsynaptophysin(シナプス小胞のマーカー)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、野生型マウスでは大脳皮質での樹状突起の形成および伸長がメチル水銀によって抑制されていたのに対し、TNFR3欠損マウスではその傷害の程度が減弱していた。一方、線条体でのシナプス小胞の形成はいずれのマウスにおいてもメチル水銀の影響をほとんど受けなかった。これらのことから、TNFR3は、少なくともメチル水銀によるマウスの大脳皮質における神経障害に関与することが示唆された。一方、脳以外の組織においてはTNFR3がメチル水銀毒性に対して防御的に作用する因子である可能性も否定できない。

*In situ hybridization*により、TNFR3発現細胞は脳全体的に分布しその中でも大脳皮質や線条体などに多く存在することが示されている。昨年度までに、TNFR3発現細胞の特定を目的としてマウス脳のパラフィン切片を作製し7種の市販抗体を用いて免疫染色を行ったが、その発現を観察することはできなかった。そこで本年度は、加熱・加圧自動処理装置(Decloaking Chamber NxGen)を用いて抗原賦活化を検討した。まず、マウス臓器の中でTNFR3が高く発現している脾臓のパラフィン切片を6種のTNFR3抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、野生型マウスでは脾臓周辺でTNFR3を発現している細胞が観察されたのに対し、TNFR3欠損マウスではその発現が認められなかった。次にTNFR3の免疫染色に成功した2種の抗体を選びマウス大脳を染色したが、いずれの抗体を用いても非特異的に染色された細胞が数多く観察され、TNFR3発現細胞の特定まで至らなかった。現在、脳組織の透明化や自動抗原賦活化装置を用いて抗原賦活化の条件などを再度検討している。一方、昨年度にTNFR3結合蛋白質として同定したRPSAに対する免疫染色を行った結果、マウス大脳皮質の神経細胞で発現していることが明らかになった。

(3) メチル水銀によるTNFR3経路を介した神経細胞死誘導の分子機構

脳神経細胞の細胞膜上に存在する可能性のあるTNFR3は、未知の経路を介してメチル水銀による細胞死に関与することを報告してきた。また、脳神経細胞のモデルとして用いているマウス脳由来神経幹細胞株では、低濃度のメチル水銀処理によって主にアポトーシスが誘導されるが、本研究の条件下においても主にアポトーシスが誘導されることを確認している。昨年度は、TNFR3に結合する新規蛋白質を網羅的に検索した結果、ラミニン結合蛋白質のRPSA(40s ribosomal protein SA)を同定したことを報告した。RPSAの発現抑制によってTNFR3量が減少したことから、RPSAはTNFR3の安定性維持に関わる可能性がある。そこでまず、7種のRPSA siRNAの中でRPSA量の低下が認められた2種のsiRNAをC17.2細胞にそれぞれ導入した結果、いずれのsiRNA導入によってTNFR3量の低下が認められたが、メチル水銀によるcaspase-3の活性化はsiRNA #1ではさらに増加したのに

対し、siRNA #2では逆に減少した。そこで、各siRNAによって分解されないRPSA発現プラスミドを作製してリカバリー実験を行った。その結果、RPSA siRNA #2の導入によって減少していたメチル水銀によるcaspase-3の活性化がsiRNA耐性RPSAを発現させることによって回復した。一方、RPSA siRNA #1によるcaspase-3の活性化の増加はsiRNA耐性RPSAを発現させても依然として認められた。このことは、RPSAがメチル水銀によるアポトーシス誘導を促進する因子であることを示唆している。次にTNFR3およびRPSAを同時に抑制した結果、それぞれの単独発現抑制によってメチル水銀によるcaspase-3の活性化が低下し、この活性化は両因子を同時に抑制してもさらに低下されることなく単独発現抑制と同程度であった。以上のことから、TNFR3はRPSAと複合体を形成することでメチル水銀によるアポトーシス誘導を促進していることが示唆された。

IV 結論

メチル水銀は脳内のミクログリアにおいてcaspase-3によるROCK1の活性化を介してSTAT3のリン酸化を促進させることでOSMを発現誘導し、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上に存在するTNFR3/RPSA複合体に結合することでアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。これまで得られた研究成果は、メチル水銀による中枢神経障害に関わる全く新しい分子機構であり、OSM/TNFR3経路を介したメチル水銀毒性発現機構を詳細に検討することで中枢神経特異的なメチル水銀毒性発現機構が明らかになるものと期待される。

V 次年度以降の計画

前述のように、メチル水銀によるOSM発現誘導機構の中でASK1/JNK1を介したcJunの活性化に関わる上流因子は不明のままである。ごく最近、メチル水銀によるcJunのリン酸化に関わる上流因子を検索していくつかの候補因子を見出した。これらの因子のメチル水銀によるcJunのリン酸化への関与を詳細に検討することで、メチル水銀によるOSM発現誘導機構の全容が明らかになるものと期待される。また、RPSAはマウスの大脳皮質の中でもメチル水銀による樹状突起の形成および伸長の抑制が観察された表層部位の神経細胞で高く発現していることを見出しており、さらに興味深いことに当該部位での損傷がTNFR3欠損マウスでは減弱していた。これらのことは、C17.2細胞を用いた検討により明らかにしたTNFR3/RPSA複合体が個体レベルにおいてもメチル水銀による大脳皮質の神経障害に関与する可能性を強く示唆している。今後これらの可能性を検討することでメチル水銀による脳選択的な毒性発現機構の解明を目指す。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Toyama T Hoshi T Noguchi T Saito Y Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- α expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia. *Sci Rep* 2021; 11:9832.
- 2) Kim JM Lee JY Kim MS Shindo S Kumagai T Naganuma A Hwang GW. Knockdown of deubiquitinating enzyme Usp34 confers resistance to methylmercury in HEK293 cells. *Fundam Toxicol Sci* 2021; 8:157-160.
- 3) Toyama T Wang Y Kim MS Takahashi T Naganuma A Hwang GW. Increased expression of TCF3, transcription factor 3, is a defense response against methylmercury toxicity in mouse neuronal C17.2 cells. *Toxicol Res* 2021; 37: 451-458.

- 4) Sato M Toyama T Kim MS Lee JY Hoshi T Miura N Naganuma A Hwang GW. Increased putrescine levels due to ODC1 overexpression prevents mitochondrial dysfunction-related apoptosis induced by methylmercury. *Life Sci* 2020; 256:118031.
- 5) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. *Environ Health Prev* 2020; 25:30.
- 6) Toyama T Xu S Nakano R Hasegawa T Endo N Takahashi T Lee JY Naganuma A Hwang GW. The nuclear protein HOXB13 enhances methylmercury toxicity by inducing oncostatin M and promoting its binding to TNFR3 in cultured cells. *Cells* 2020; 9:45.
- 7) Takahashi T Kim MS Lee JY Iwai-Shimada M Hoshi T Fujimura M Toyama T Fujiwara Y Naganuma A Hwang GW. Induction of chemokine CCL3 by NF- κ B reduces methylmercury toxicity in C17.2 mouse neural stem cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2019; 71:103216.
- 8) Kim MS Takahashi T Lee JY Toyama T Hoshi T Kuge S Fujiwara Y Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces the expression of chemokine CCL4 via SRF activation in C17.2 mouse neural stem cells. *Sci Rep* 2019; 9: 1: 4631.
- 9) Hoshi T Toyama T Naganuma A Hwang GW. Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. *Fundam Toxicol Sci* 2019; 6:167-170.
- 10) Hoshi T Toyama T Shinozaki Y Koizumi S Lee JY Naganuma A Hwang GW. Evaluation of M1-microglial activation by neurotoxic metals using optimized organotypic cerebral slice cultures. *J Toxicol Sci* 2019; 44:471-479.
- 11) Sato M Toyama T Lee JY Miura N Naganuma A Hwang GW. Activation of ornithine decarboxylase protects against methylmercury toxicity by increasing putrescine. *Toxicol and Appl pharmacol* 2018; 356:120-126.
- 12) Takahashi T Kim MS Iwai-Shimada M Fujimura M Toyama T Naganuma A Hwang GW. Induced chemokine CCL4 has a protective role against methylmercury toxicity. *Toxics* 2018; 6:36.
- 13) Sato M Lee JY Kim MS Takahashi T Naganuma A Hwang GW. Putrescine selectively alleviates methylmercury toxicity in C17.2 mouse neural stem cells. *Fundam Toxicol Sci* 2018; 5:71-73.
- 14) Kobayashi T Toyama T Lee JY Miura N Kuge S Naganuma A Hwang GW. Methylmercury Enhances Cytotoxicity through Inhibition of Its Activity by a Decrease in PTEN Solubility *BPB report* 2018; 1:1-5.
- 15) Takahashi T Wang Y Toyama T Kim MS Kuge S Hwang GW Naganuma A. Small interfering RNA-mediated knockdown of the transcription factor TCF3 enhances sensitivity to methylmercury in mouse neural stem cells. *Fundam Toxicol Sci* 2017; 4:41-43.
- 16) Kim MS Takahashi T Lee JY Miura N Asanuma M Hwang GW Naganuma A., Identification of transcription factors activated by methylmercury in mouse brain. *Fundam Toxicol Sci* 2017; 4:37-39.

Mechanism of neuronal cell death induction via TNF receptor 3 by methylmercury

Gi-Wook Hwang

*Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku Medical and Pharmaceutical University, Sendai 981-8558, Japan*

Keywords: Methylmercury; Oncostatin M; TNFR3; STAT3; ROCK1; Caspase-3

Abstract

We have previously found that methylmercury (MeHg) induces the expression of oncostatin M (OSM, a member of IL-6 molecular species) in the microglia, and that extracellular OSM may induce neuronal cell death via TNF receptor 3 (TNFR3). We also reported that MeHg induces the expression of OSM by activating the transcription factors STAT3 and cJun (AP-1), and that the JAK1 and ASK1/JNK pathways are involved in the activation of these factors, respectively. In this study, we investigated the mechanisms involved in the induction of OSM expression and TNFR3-mediated cell death by MeHg, and examined the involvement of TNFR3 in MeHg-induced neuronal damage using TNFR3-knockout mice.

JAK1 and ASK1 are activated when their ligands bind to receptors on the cellular membrane. Therefore, we prepared a condition medium containing factors that are released from BV2 cells upon exposure to MeHg, and no induction of OSM expression was observed in BV2 cells newly cultured in this medium. It was also suggested that the pathways known to be involved in the activation of ASK1 were not involved in the induction of OSM expression by MeHg. In contrast, suppression of ROCK1, which is involved in microglial activation, decreased the induction of OSM expression and phosphorylation of STAT3 by MeHg. Moreover, this decrease and the formation of truncated ROCK1 (activated form) by caspase-3 were almost completely abolished when caspase-3 was suppressed. These results suggest that MeHg induces OSM expression by phosphorylating STAT3 through the activation of ROCK1 by caspase-3. We also found that the formation and elongation of neuronal axons was inhibited by MeHg in the cerebral cortex of wild-type mice after 8 weeks of ad libitum drinking of MeHg, whereas the damage was attenuated in TNFR3-knockout mice. This result strongly suggests that TNFR3 is involved in MeHg-induced neuronal damage in the cerebral cortex of mice. Finally, suppression of RPSA, which was identified as a TNFR3-binding protein, reduced MeHg-induced activation of caspase-3, and this activation was not further reduced by co-suppression of both factors, but was the same level as that of single suppression. This result suggests that TNFR3 promotes apoptosis induced by MeHg by forming a complex with RPSA.

These findings suggest that MeHg induces OSM expression by promoting STAT3 phosphorylation through activation of ROCK1 by caspase-3, and that TNFR3, which binds to extracellular OSM, may be involved in MeHg-induced neurological damage in the cerebral cortex by forming a complex with RPSA in mice.