

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」の支援を得て研究を実施し、ラット後根神経節 (DRG) を材料として、メチル水銀の感覚神経への毒性発現に TNF- α シグナルカスケードの活性化およびマクロファージの集積が関与し得ることを見出した。一方、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、組織学的な解析の結果、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。令和3年度はこれらの知見を詳細に検討した。その結果、(1) メチル水銀は DRG において、アポトーシス、ネクロプトーシス、ネクローシスの3つの様式で細胞死を引き起こすこと、(2) これには DRG におけるカスパーゼ 3/8 および TNFR-RIP3-MLKL 経路の活性化が関与すること、(3) TNF- α はメチル水銀曝露で生じるマクロファージに由来すると推察され、マクロファージ様細胞ではメチル水銀により TNF- α の発現が上昇すること、(4) この誘導は NF κ B および EGFR-(ERK1/2, p38 MAPK) 経路によって介在されること、一方、(5) メチル水銀を投与したラットでは、冷覚、温覚および圧覚の変化は認められなかったが、痛覚はいったん有意に鈍麻し、その後は回復していくこと、(6) 組織学的にもメチル水銀による DRG ニューロンおよび感覚神経軸索の顕著な脱落が起こるが、それは時間とともに回復すること、が示された。以上を総合すると、メチル水銀は DRG にマクロファージを集積させ、カスパーゼ 3/8 および TNF- α シグナルの活性化を通じてネクローシスだけでなくアポトーシスおよびネクロプトーシスで感覚神経細胞死を引き起こし、それが特に可逆的な痛覚の鈍麻につながる可能性が示唆される。本研究は、水俣病における末梢神経障害の分子・細胞的基盤理解に貢献するものであると考える。

キーワード：メチル水銀、末梢神経、感覚神経、TNF- α

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)

中野 毅・東京理科大学 薬学部 環境健康学研究室 (助教)

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・細胞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- α 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¹⁾、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事象として存在することを見出した²⁾。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、そのメカニズムとして 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- α 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ことである。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ことである³⁾。

本年度は、第一に培養ラット DRG を用い、メチル水銀による感覚神経細胞死の様式を評価した。第二に、その様式介在する細胞内シグナル経路を解析した。第三に、TNF- α の関与が示唆されたので、メチル水銀に曝露した培養マクロファージ様細胞における TNF- α の発現と TNF- α シグナルの活性化を調べた。第四に、メチル水銀を投与したラットにおける DRG の組織学的変化および感覚モダリティ（冷覚、温覚、圧覚および痛覚）の変化を経時的に調べた。

II 研究方法

方法 1. メチル水銀による DRG 細胞死の様式

三協ラボサービス株式会社より購入した 3~4 週齢の雄性 Wistar ラットの胸椎から仙椎にわたる領域を摘出し、ラット DRG 神経細胞（感覚神経）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^{4,5)}、DRG 細胞を 7 日間、10% FBS-DMEM にて培養した後、実験に供した。メチル水銀は 1% BSA-DMEM を用いて 0.5, 1 および 3 μ M に調製し使

用した。アポトーシスは Tunel 染色で検出した。ネクローシスおよびネクロプトーシスは、FACSCalibur Flow Cytometer による分離において、Annexin V および Propidium iodide 陽性細胞として検出し、その中で Necrostatin-1 によって減少した細胞数をネクロプトーシスとして評価した。

方法 2. メチル水銀による DRG 細胞死を介在する細胞内シグナル経路

アポトーシスを介在するシグナル分子であるカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 3 のリン酸化をウエスタンブロット法で検出した。TNF- α によるネクロプトーシスを介在し得るシグナル分子である TNF- α および TNFR1 の発現ならびに RIP1, RIP3 および MLKL のリン酸化もウエスタンブロット法で検出した。

方法 3. メチル水銀に曝露したマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞における TNF- α の発現

RAW264.7 細胞を 5×10^4 cells/cm² の条件で播種し、10%ウシ胎児血清含有 DMEM で 12 時間培養後、無血清条件の DMEM で 12 時間培養した後にメチル水銀で処理した。細胞内のタンパク質の発現はウエスタンブロット法、培養上清中への TNF- α タンパク質の分泌量は ELISA 法、TNF- α mRNA は Real time RT-PCR 法でそれぞれ測定した。TNF- α の発現を誘導し得るシグナル分子として、NF κ B および MAPKs (ERK1/2, p38 MAPK および JNK) の活性化をウエスタンブロット法で評価した。TNF- α の発現誘導へのそれらの関与を阻害剤 BAY 11-7082 (NF- κ B), PD98059 (ERK1/2), SB203580 (p38 MAPK), SP600125 (JNK) および PD153035 (EGFR) によって調べた。

方法 4. 感覚モダリティの評価

東京実験動物より購入した雄性 Wistar Rat (9 週齢) に、2 mg/mL に調製した塩化メチル水銀水溶液を、ゾンデにより経胃的に 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。体重測定、後肢交差、生存率の確認を行うとともに、コントロール及びメチル水銀投与群をそれぞれ Foot shock test (侵害刺激・痛覚) と Tail flick test (温感刺激・温覚) を行う群、及び von Frey test (圧力刺激・圧覚) と Tail dipping test (冷感刺激・冷覚) を行う群の 2 群に分け、それぞれの群において 2 つの感覚応答実験を 1 日 1 回、70 日間行なった。

方法 5. 感覚神経細胞及び感覚神経・運動神経線維の組織学的検討

投与開始 7, 14, 70 日後に二酸化炭素で深麻酔し、心臓より 200 mL の PBS を灌流、続いて 4% PFA / 0.1 M PB 溶液を灌流して組織固定した。腰椎 (L3-L5) より後根神経節、感覚神経線維、運動神経線維を摘出し、20% sucrose / PBS 溶液に置換後 OTC コンパウンドに包埋、クライオスタットにて凍結標本を作成し、常法に従って神経細胞マーカーである抗

neurofilament 抗体及び髄鞘マーカーである抗 MBP 抗体にて蛍光免疫組織化学染色を行った。染色した標本の写真を撮影し、neurofilament 抗体で染色された神経細胞および神経線維の単位面積あたりの数について定量評価を行なった。

(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および遺伝子組換え実験安全委員会で承認されたものであり(承認番号 Y20018, Y20019 および 1882), 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(P20-19), 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

1. メチル水銀による DRG 細胞死の様式

メチル水銀に曝露した DRG 神経細胞では, Tunel 陽性細胞が有意に増加した。AHC 神経細胞やシュワン細胞では, このような変化は認められなかった。一方, DRG 神経細胞において, メチル水銀は Annexin V 陽性細胞および Annexin V/Propidium iodide 陽性細胞をともに増加させた。Annexin V/Propidium iodide 陽性細胞の増加は RIP1 阻害剤である Necrostatin-1 によって半減した。

2. メチル水銀による DRG 細胞死を介在する細胞内シグナル経路

DRG 神経細胞において, メチル水銀はアポトーシスに関与するカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 3 の発現を増加させた。カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 3 の活性化の上昇も観察された。一方, メチル水銀は, ネクロプトーシスに関与する TNF 受容体 (TNFR1)mRNA, RIP1 mRNA および RIP3 mRNA の発現レベルを上昇させた。TNFR1 タンパク質ならびにその顆粒シグナル分子である RIP3 および MLKL のリン酸化もメチル水銀によって上昇していた。

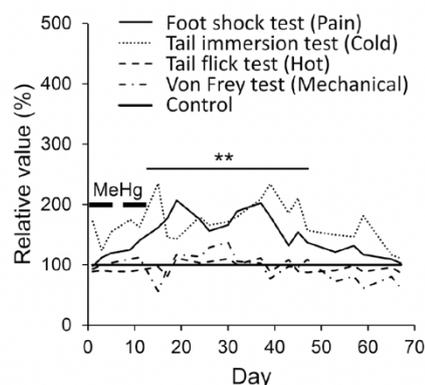
3. メチル水銀に曝露したマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞における TNF- α の発現

メチル水銀は, RAW264.7 細胞からの TNF- α タンパク質の分泌を濃度および時間依存的に増加させた。TNF- α mRNA レベルの上昇も認められた。RAW264.7 細胞において, メチル水銀は I κ B- α のリン酸化を増加させ, NF κ B の核への移行を促進した。NF κ B 阻害剤 BAY 11-7082 は, メチル水銀による TNF- α タンパク質の分泌増加と TNF- α mRNA レベルの上昇をともに有意に抑制した。メチル水銀による TNF- α タンパク質の分泌増加と TNF- α mRNA レベルの上昇は, EGFR ブロッカーである PD153035 によっても有意に抑制された。

そこでその下流シグナル分子である MAPKs (ERK1/2, p38 MAPK および JNK) のリン酸化に対するメチル水銀の作用を調べたところ、メチル水銀によって全ての MAPKs の濃度依存的な活性化が認められた。メチル水銀による TNF- α mRNA レベルの上昇は p38 MAPK 阻害剤である SB203580 によってのみ有意に抑制されたが、TNF- α タンパク質の分泌増加は ERK1/2 経路阻害剤である PD98059 および SB203580 によって有意に抑制された。JNK 阻害剤 SP600125 は、メチル水銀による TNF- α タンパク質の分泌増加にも TNF- α mRNA レベルの上昇にも影響を及ぼさなかった。

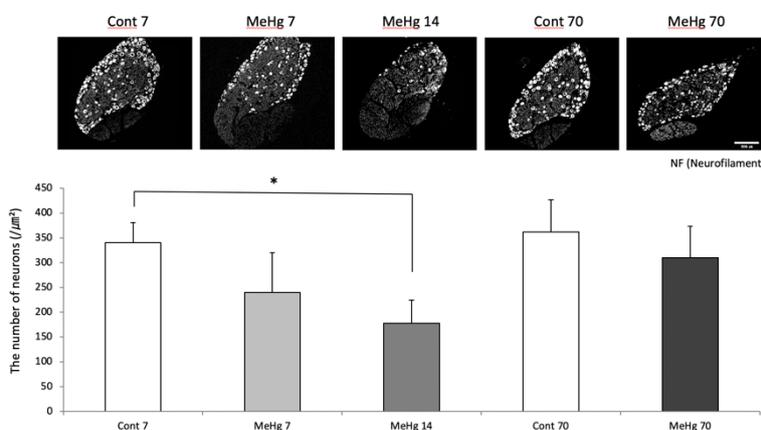
4. 感覚モダリティの評価

感覚神経障害における種々感覚モダリティのメチル水銀感受性に差が見られるかどうかを明らかにする目的で、水俣病モデルラットを作成し種々感覚行動解析を行った。後肢交差の程度をスコア化したところ、メチル水銀投与群は投与開始 3 週目より有意に高いスコアを示し、それは投与開始 70 日まで持続した。種々感覚モダリティの行動解析においては、冷覚、温覚、触圧覚については観察期間中コントロールと同一の応答特性を示したものの、痛覚は投与開始 11 日目から 48 日目にかけて有意な鈍麻を示した。さらに、投与開始 48 日目以降はコントロールレベルまで回復した。



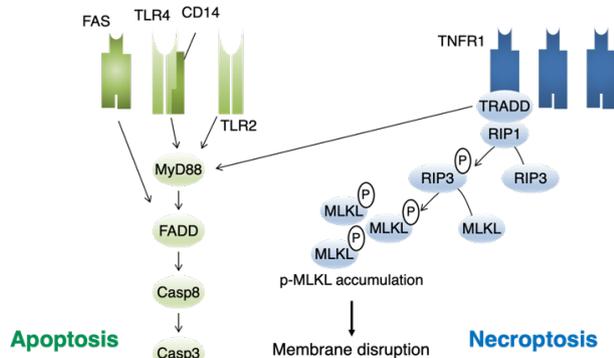
5. 感覚神経細胞及び感覚神経・運動神経線維の組織学的検討

上記痛覚鈍麻とその経時回復についての組織学的基盤を検討する目的で、投与開始 7 日、14 日、70 日における腰椎 DRG 神経細胞及び感覚神経線維、同領域の運動神経線維を神経細胞マーカー及び髄鞘マーカーで免疫染色して定量評価したところ、投与開始 7 日ではコントロールと差がなかったのに対し、14 日では有意な神経細胞及び感覚神経線維の脱落が観察された。一方、投与開始 70 日における DRG 神経細胞及び感覚神経線維はコントロールと比較して定量的に有意差がつかなかった。すなわち、上記痛覚鈍麻とその経時回復は、神経細胞及び感覚神経線維の新生によるものである可能性が示唆された。



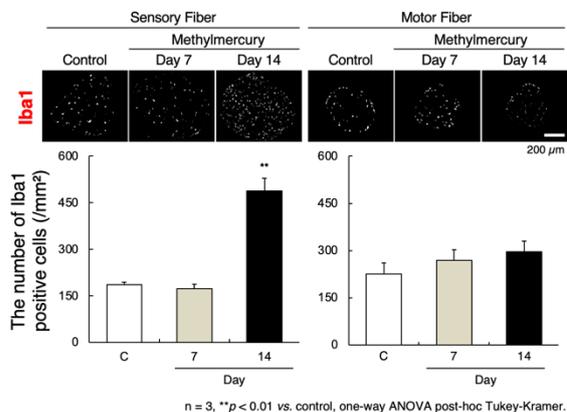
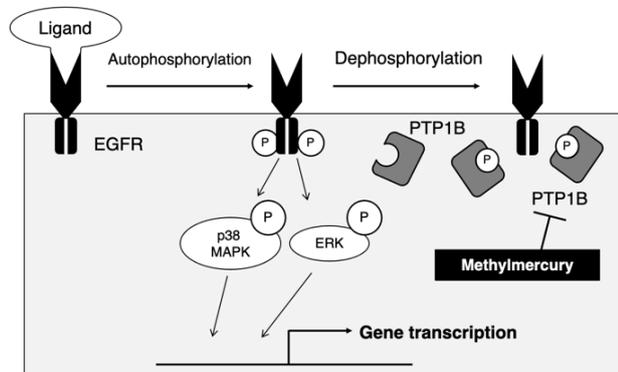
IV 考察および V 結論

メチル水銀による DRG 神経細胞死の様式は、Tunel 陽性細胞の増加および Flow Cytometer による解析の結果から、アポトーシス、ネクロプトーシスおよびネクローシスの 3 つが起こっていることが示唆される。アポトーシスについては、メチル水銀によってカスパーゼ 3/8 の活性化によって発生していることが示唆された。一方、ネクロプトーシスについては、TNFR1 の下流にある RIP1-RIP3-MLKL 経路の活性化によることが示唆された。



上記の結果から、ネクロプトーシスには TNF- α が関与すると考えられるが、DRG 神経細胞ではメチル水銀による TNF- α の発現誘導は認められなかった。しかしながら、メチル水銀はマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞において TNF- α の発現を誘導した。この誘導は, NF κ B および EGFR-(ERK1/2, p38 MAPK) 経路によって介在されることが示唆された。NF κ B 経路の活性化は I κ B- α の活性化に起因することが示されたが、メチル水銀が I κ B- α を活性化するメカニズムは不明である。

一方、我々は、血管内皮細胞において、メチル水銀が PTP1B を阻害することによって EGFR の自己リン酸化が増加し、その下流シグナル分子である ERK1/2 および p38 MAPK が活性化されることを報告している 6)。このことから、メチル水銀はマクロファージにおいても同様のメカニズムで ERK1/2 および p38 MAPK の下流にある TNF- α 遺伝子の発現を上昇させると考えられる。



本研究プロジェクトの過程において、我々はメチル水銀に曝露したラットにおいて、マクロファージと考えられる CD68/Iba1 陽性細胞が感覚神経線維に浸潤していくことを見出している。メカニズムはわからないが、そのような現象は運動神経線維には認められない。これらの結果から、メチル水銀は感覚神経線維へのマクロファージの浸潤を促すだけでなく、浸潤し

たマクロファージからの TNF- α の分泌を刺激して、メチル水銀によって活性化される感覚神経細胞のアポトーシスおよびネクロプトーシスを増強するものと考えられる。

メチル水銀による感覚モダリティの変化は重要であるが、その詳細には不明な点が多い。本研究において、メチル水銀が感覚モダリティのうち、特に痛覚を鈍磨させることが示された。しかもこの鈍麻はメチル水銀投与後の時間経過にともなって回復した。このとき、組織学的にも DRG 神経細胞及び感覚神経線維の数的回復が認められた。この回復が神経新生によるものかどうかは現時点では不明である。また、もし神経新生が起こったとしても、それが痛覚受容細胞に選択的なものであるかどうかとも検討が必要である。さらに、メチル水銀曝露後の DRG 神経細胞の数的回復のメカニズムも不明である。しかしながら、メチル水銀による痛覚の選択的鈍磨とその回復が動物実験で確認された意義は大きいと考える。

本研究プロジェクトの過程で、我々は TNF- α ノックアウトマウスを用いて、メチル水銀による感覚神経障害に TNF- α が関与していることを見出している。この結果を含むこれまでの知見と本研究の結果を総合して考えると、メチル水銀による末梢神経障害の分子・細胞的基盤として、以下の仮説が成立すると思われる。すなわち、『(1) メチル水銀は感覚神経線維へのマクロファージの浸潤を促すとともに、NF κ B および EGFR-(ERK1/2, p38 MAPK) 経路に介在される TNF- α の分泌を増加させる。(2) 一方、メチル水銀に曝露した DRG 神経細胞では TNFR1 の発現が上昇しているため TNF- α に感受性となっており、その下流シグナルである RIP-1-RIP3-MLKL 経路の活性化によるネクロプトーシスを含む感覚神経細胞死が誘導される。(3) メチル水銀は LAT-1 の発現が高く MRP-2 の発現が低い DRG 神経細胞に多く蓄積して細胞毒性を発現することは、その細胞死を増強する要因となる。(4) このような感覚神経細胞死は、メカニズムは不明であるが痛覚受容細胞に強く起こる。この痛覚受容細胞の傷害は時間の経過とともに回復することが可能である。』不明な点は多く残っているが、我々の研究結果は、メチル水銀による感覚神経優位な傷害に分子・細胞的基盤が存在することを示している。

VI 今後の課題

本研究によってメチル水銀による感覚神経優位な傷害に分子・細胞的基盤が存在することが示されたが、これを詳細に検証するために以下の課題の解決が必要であると思われる。

(1) 本研究の結果はメチル水銀による感覚神経の障害に TNF- α が強く関与していることを示唆している。また、メチル水銀による感覚神経の障害が可逆的であることも示唆された。これらの知見から、抗 TNF- α 活性を有する薬剤がメチル水銀による感覚神経障害を軽減活性あるいは回復促進活性を有する可能性が考えられるが未確認である。

(2) 感覚神経線維へのマクロファージの浸潤およびマクロファージにおける TNF- α の誘導がメチル水銀によって起こることは、メチル水銀による感覚神経の障害の細胞的基盤として重要だと思われる。TNF- α の誘導の分子的基盤については本研究が明らかにしたところであるが、マクロファージ浸潤のメカニズムは不明である。

(3) メチル水銀による感覚モダリティの変化は重要であるが、本研究の結果はメチル水銀が特に痛覚を鈍磨させることが示された。しかしながら、メチル水銀の毒性が痛覚受容細胞に選択的に起こるかどうかわかりませんが、もし起こるならばどのようなメカニズムで痛覚受容細胞が選択されるのか、その際のメチル水銀に対する標的分子は何なのか、はいずれも不明である。

(4) メチル水銀による痛覚鈍麻の回復と DRG 神経細胞の数的回復の関係を明らかにするために、まず、DRG 神経細胞の回復が神経新生によるものかどうか、もし神経新生が起こっているならば、それが痛覚受容細胞に選択的なものであるかが不明である。

(5) メチル水銀が痛覚に作用するメカニズムを検討する必要がある。上記と併せ、分子レベルでの解明が期待される。

(6) メチル水銀による感覚神経障害への中枢神経障害の関与には、まだ不明な点が残されている。その解明も重要な課題である。

上記課題の解決は、メチル水銀による感覚神経優位な傷害に分子・細胞的基盤の基礎研究と水俣病の臨床をつなぐ意味で重要と考えられる。

本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**, 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**, 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.
- 3) [Shinoda Y*](#), Yamada Y, [Yoshida E](#), Takahashi T, Tsuneoka Y, Eto K, [Kaji T*](#), Fujiwara Y*. *J. Toxicol. Sci.* (2021) **46**, 303-309. Hypoalgesia and recovery in methylmercury-exposed rats.

引用文献

- 4) 米沢猛. 組織培養. 中井, 岡本編. 朝倉書店. 1964; 392.
- 5) Braschler UF, Iannone A, Spenger C, Streit J, Lüscher H-R. *J. Neurosci. Meth.* (1989) **29**, 121-129. A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle.
- 6) Yoshida E, Kurita M, Eto K, Kumagai Y, Kaji T*. *Toxicology* (2017) **392**, 40-46. Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells via induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity.

Molecular and Cellular Basis of Peripheral Neuropathy Induced by Methylmercury

Toshiyuki Kaji¹, Yo Shinoda², Tsuyoshi Nakano¹

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

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

Key words: Methylmercury; Peripheral nervous system; Sensory neuron; TNF- α

Abstract

Since Minamata disease is a central nervous system disorder known as Hunter-Russell syndrome, studies on the mechanisms underlying the toxicity of methylmercury have been conducted mainly on the cell types that constitute the central nervous system. However, research on peripheral nerve damage, especially sensory nerve damage, which was observed in the early stages of Minamata disease, has been insufficient. Recently, we found that activation of the TNF- α signaling cascade and accumulation of macrophages may be involved in the toxicity of methylmercury to sensory nerves in rat dorsal root ganglia (DRG). On the other hand, behavioral and histological analyses of the vulnerability of various sensory modalities involving peripheral sensory nerves to methylmercury toxicity suggested that there may be specificity in the expression of methylmercury toxicity for each sensory modality. We examined these findings in detail. As a result, we found that (1) methylmercury induces apoptosis, necroptosis, and necrosis in DRG, (2) activation of caspase 3/8 and TNFR-RIP3-MLKL pathways in DRG is involved in apoptosis and necroptosis, respectively, and (3) TNF- α may originate from macrophages infiltrated into DRG/sensory nerve fiber after exposure to methylmercury; methylmercury induces TNF- α expression in macrophage-like cells, (4) this induction is mediated by the NF κ B and EGFR-(ERK1/2, p38 MAPK) pathways, (5) in rats treated with methylmercury, there was no change in cold, warmth, or pressure sensation, but pain sensation was significantly dulled and then recovered, and (6) histologically, methylmercury-induced marked loss of DRG

neurons and sensory axons was observed, which recovered with time. From these results, we suggest that methylmercury induces macrophage accumulation in DRG, and through activation of caspase-3/8 and TNF- α signaling, causes sensory neuron death by apoptosis and necroptosis as well as necrosis, which may lead to reversible blunting of pain perception. This study will contribute to the understanding of the molecular and cellular basis of peripheral neuropathy in Minamata disease.