

メチル水銀の低濃度曝露によるミクログリアの活性化機構と その毒性学的意義の解明

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、メチル水銀が様々な炎症性サイトカインの発現誘導を介して細胞死を誘導することを、マウス神経幹細胞株を用いた検討により明らかにしてきた。また最近、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炎症性サイトカインが発現誘導されることや、ミクログリアを選択的に死滅させるクロドロン酸内包リポソームでマウス脳スライスを前処理することによってメチル水銀による神経細胞死が抑制されることを見出している。そこで本研究では、個体レベルでのメチル水銀による脳神経障害におけるミクログリアの関与についてマウスの行動解析および免疫組織染色により検討した。まず、C57BL/6Nマウスの雄に対しメチル水銀含有水曝露（20, 30, 40 ppm）を8週間行ったところ、対照群と比較して40 ppm曝露群において僅かな体重減少が認められた。また、マウス脳組織を免疫染色により調べた結果、30 ppm曝露マウスの大脳皮質において神経細胞の樹状突起損傷およびミクログリアの活性化が観察され、これらの程度は30 ppmより40 ppm曝露マウスの方が顕著であった。さらに、30 ppmのメチル水銀を6~8週間曝露したマウスを用いて行動解析を行ったところ、うつ様行動、社交性、衝動性および自発運動量はほとんど変動せず、短期および長期の記憶機能が低下していた。特にこの記憶機能の低下はメチル水銀曝露6週目から惹起したが、本曝露条件では少なくとも大脳皮質および海馬における神経細胞体の損傷（主に細胞死）はほとんど認められなかった。また、マウス脳中のミクログリアを除去する目的でPLX3397（CSF1R阻害剤）を粉末餌に混ぜて摂取させた結果、30%程度のミクログリアが減少するとともにメチル水銀による短期および長期の記憶障害が認められなくなった。以上のことから、マウス脳内においてメチル水銀はミクログリア活性化を介して記憶機能障害を惹起していることが示唆された。

キーワード：メチル水銀、ミクログリア

研究者協力者

山縣 涼太（東北医科薬科大学薬学部助教）

I 研究目的

これまでに我々は、メチル水銀がオンコスタチンMやTNF- α 、IL-1 β 、CCL2などの炎症性サイトカイン類の発現誘導を介して細胞死を誘導することを、マウス神経幹細胞株を用いた検討により明らかにしてきた。また、上記の炎症性サイトカイン類はメチル水銀を投与したマウスの脳内ミクログリアにおいて発現誘導されることも見出している。一方、マウス脳スライスをメチル水銀で処理して神経細胞死を誘導する条件下において上記の炎症性サイトカイン類の発現誘導は認められなかった。また、本細胞死はミクログリアを選択的に死滅させるクロドロン酸内包リポソームの処理によって抑制された。

これらのことから、低濃度のメチル水銀は既知の炎症性サイトカイン類を発現誘導することなくミクログリアを介して神経細胞死を誘導する可能性が考えられる。そこで本研究では、マウスの個体レベルでのメチル水銀による脳神経障害におけるミクログリアの関与についてマウスの行動解析および免疫組織染色により検討した。

II 研究方法

1. マウスへのメチル水銀およびミクログリア除去剤 (PLX3397) の投与

5週齢の雄性C57BL/6Nマウスは、実験に供するまで温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗12時間サイクル（明期 7:00-19:00、暗期 19:00-7:00）に管理されている環境下で飼育した。なお、飼育には、プラスチックケージ（縦30 cm×横20 cm×高さ15 cm）に1ケージにつき4匹ずつ飼育した。飼育期間中は、粉末飼料CE-2（日本クレア）および次亜塩素酸（5 ppm）を含む水道水を自由に摂取させた。実験期間中は、終濃度0～40 ppmの含有水を6週齢の雄性マウスに6～8週間自由摂取させた。コントロール群には、還元型GSHのみ（メチル水銀投与群と等量）を次亜塩素酸（5 ppm）を含む水道水に溶解させた飲料水を同期間摂取させた。また、ミクログリア除去剤（PLX3397）添加飼料は、CE-2粉末飼料1 kgあたりに290 mgのPLX3397が含まれるように混合調製し、粉末給餌缶に入れて自由に与えた。尚、コントロールに用いたマウスにはCE-2粉末飼料のみを自由に与えた。

2. マウスの行動解析

メチル水銀曝露の6週間後より、マウスの短期および長期の記憶機能、社交性、衝動性、うつ様行動、自発運動量を順次測定した。連続する行動試験は2日以上以上の休息期間を設けて実施した。尚、マウスは行動測定を行う環境に少なくとも30分以上馴化させた後に実験に使用した。

2-1. Y-maze test（短期記憶機能）

マウスは、長さ40cm、幅10cm、高さ12cmのアームを持つ対称型Y字迷路装置のアームの一端に置き、8分間装置内を自由に探索させた。マウスが連続して異なる3つのアームを選択した時を交替行動としてカウントし（例えば、ACBCABCBCABB という測定結果では交代行動が6回と記録される）、交替行動率（alternation behavior (%)）を以下の式により算出した。尚、総侵入回数が8回未満のマウスは不適合と判断し、データから除外した。

$$\text{交替行動率} = \frac{\text{交差行動回数}}{(\text{総進入回}-2)} \times 100$$

2-2. Passive avoidance test（長期記憶機能）

Passive avoidance 装置は往復可能な暗室と明室の2つの箱から構成されている。獲得試行では、暗室に背を向ける形でマウスを明室に入れ、マウスの四肢が完全に暗室に侵入した際に電気刺激（1 mA、0.5 sec）を加えた。マウスを再度明室に入れ、明室に留まらず5分以内に暗室に侵入したマウスは再度同じ電気刺激を加えた。電気刺激による獲得試行は最大で2回までとし、その間に5分間明室に留まることができたマウスを実験に使用した。再生試行では、獲得試行と同様にマウスを暗室に背を向ける形で明室に入れ、暗室に入るまでの時間を10分間計測した。

2-3. Social interaction test (社交性)

測定対象マウスを1時間個別飼育した後に、個別飼育していないゲストマウスをプラスチックケージの対角線上で引き合わせ、10分間ビデオカメラにて撮影した。そして、測定対象マウスについて、社会的行動であるにおい嗅ぎ (Sniffing) の累積時間を測定した。

2-4. Cliff avoidance test (衝動性)

マウスの体長の2倍以上の高さのある直径15 cm丸底トールビーカーを底が上になるように設置し、底面にマウスを置いてから落下するまでの時間を7分間ビデオカメラにて撮影した。嗅覚の影響を防ぐため、試験と試験の間に75%エタノールでビーカーを洗浄した。

2-5. Tail suspension test (うつ様行動)

マウスの尾の先端をマウスが床に付かない高さに設置したヒモにテープで固定し、逆さの状態のマウスを10分間ビデオカメラにて撮影し、無動時間を測定した。

2-6. 自発運動量

マウスをプラスチックケージ (縦24 cm×横17 cm×高さ12 cm) に1匹ずつ入れ、自発運動量測定装置 (Supermex) を用いてマウスの自発運動量を105分間測定し、総運動量および15分間隔の平面運動量を自動的に数値化した。

3. 免疫組織化学的染色 (DAB染色および蛍光染色)

行動実験を終えたマウスは三種混合麻酔薬を用いて麻酔した。開腹後、心臓の心尖部から左心室内にカニューレを挿入し、血液と灌流液を排出させるために右心室の一部を切開した。一定の流速 (5 mL/min) で氷冷した PBS を 20 mL 灌流し脱血した後、直ちに氷冷した 4% PFA-in PBS (固定液) を同じ流速で 40 mL 灌流し、組織を固定した。灌流固定後、脳を摘出し、4°Cの固定液に浸して再固定を行った。ホルマリン固定した脳組織は、本学組織・病理標本センターにパラフィン包埋および脳切片作製 (4 μm スライス) を外注した。得られた脳切片はキシレンで5分おきに2回インキュベートし、脱パラフィン処理を行った。その後、100%エタノールで2回、95%エタノールで2回、70%エタノールで1回、それぞれ5分おきにインキュベートし、脱キシレン処理を行った。切片はイオン交換水で3分間インキュベートした後、antigen decloaker に浸して抗原不活化装置にて抗原賦活化処理 (110°C、3分間) を行った。30分間室温にて冷ました後、イオン交換水で置換した。イオン交換水で洗浄した脳切片は、0.3% hydrogen peroxide で15分間インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。T-TBS で5分おきに2回洗浄した後、脳組織への抗体の非特異的結合を防ぐ目的で、10% NGS-in PBS で室温にて60分間反応させた。T-TBS で5分おきに2回洗浄し、1% NGS-in PBS で1000倍希釈した Iba1 抗体と4°Cで一晩反応させた。サンプルを T-TBS で5分おきに2回洗浄後、1% NGS-in PBS で200倍希釈した二次抗体 (biotinylated anti-rabbit IgG) と室温で15分間反応させた。T-TBS で5分おきに2回洗浄後、PBS で50倍希釈した EAP を室温で20分間反応させた。T-TBS で5分おきに2回洗浄後、DAB chromagen をサンプルに添加し、顕微鏡で発色を観察しながら、反応時間を決定した (最大6分)。イオン交換水で DAB を除いた後、Modified Harris Hematoxylin に10秒間浸して対比染色を行い、流水で置換した。T-TBS に1分間インキュベートした後、70%エタノールで1回、95%エタノールで2回、100%エタ

ノールで2回、順番に3分間インキュベートし、脱水処理を行った。Xylenで15分おきに2回インキュベートして透徹処理を行った後、PermountTMで封入し検鏡した。一方、蛍光染色は脱パラフィン処理後、抗原を賦活化した組織を用いた。室温に戻して精製水で置換した後、PBSで室温5分間×2回でwashし、非特異的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×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×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。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、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) マウスへのメチル水銀の投与条件およびその毒性評価法の検討

我々はこれまでに、40 ppmのメチル水銀を含む水を自由に摂取したマウスの脳において神経細胞傷害が生じることを見出していた。そこでまず、20 ppmから40 ppmのメチル水銀を8週間投与したところ、以前と同様に40 ppmのメチル水銀投与群はコントロール群に比べて体重が僅かに減少した。また、神経細胞への低濃度のメチル水銀の影響を正確に検出するために、シナプトフィシンの抗体でシナプス小胞を、また、MAP2の抗体で神経細胞の樹状突起を可視化した。その結果、コントロール群においてドット状のシナプス小胞が観察されたが、これらは40 ppmのメチル水銀投与群においてもほとんど減少することなく依然として認められた。一方で、神経細胞の樹状突起はコントロール群において筋状に伸びていることが観察され、この長さは30 ppmのメチル水銀投与群においてコントロール群に比べて30%程度短くなっており、40 ppm投与群では顕著な低下が認められた。なお、免疫染色による可視化方法についても検討した結果、蛍光染色がDAB染色よりメチル水銀の影響を評価する上で有効であった。これらの結果から、メチル水銀の投与濃度を30 ppm、投与期間を最大8週間とし、マウスの行動解析を実施することにした。

(2) マウスの行動解析によるメチル水銀の毒性評価

30 ppmのメチル水銀を含む水を最大8週間自由飲水させたC57BL/6Nマウスを用いて行動解析項目として、① Y-maze test (短期記憶)、② Passive avoidance test (長期記憶)、③ Social interaction test (社交性)、④ Cliff avoidance reaction test (衝動性)、⑤ Tail suspension test (うつ様行動)、⑥ Supermex[®] test (自発運動量)を、各々の検討項目が干渉しないようにメチル水銀投与6週から8週にわたって実施した。その結果、メチル水銀は、Social interaction test、Cliff avoidance reaction test、Tail suspension testおよびSupermex[®] testにおけるマウスの行動にほとんど影響を与えなかった。一方で、メチル水銀投与6週目で実施したY-maze testでの交替行動率、またその後実施されたPassive avoidance testでの暗室への入室時間が有意に低下したことから、メチル水銀はマウスの短期および長期の記憶機能を低下させることが示唆された。一方で、マウスの社会性、衝動性、うつ様行動および自発運動量は、少なくとも今回の行動解析条件下においてメチル水銀の影響を

ほとんど受けないことが判明した。

(3) メチル水銀による記憶機能障害へのミクログリアの関与

メチル水銀が脳内ミクログリアに与える影響を検討する目的で、ミクログリア除去剤であるPLX3397 (CSF1R阻害剤) を粉末餌に混ぜてマウスに6週間摂取させた。その結果、メチル水銀投与群においてY-maze testでの交替行動率およびPassive avoidance testでの暗室への入室時間の低下が認められ、これらの低下はPLX3397の同時投与によってほとんど認められなくなった。このことは、メチル水銀がミクログリアを介してマウスの記憶機能障害を惹起することを示唆している。次に、大脳皮質および海馬でのミクログリアをIba1抗体により免疫染色し、細胞体の直径が10 μm以上のIba1陽性細胞をミクログリアとしてカウントした。その結果、30 ppmのメチル水銀を投与してもコントロール群に比較してミクログリアの数に大きな違いは認められなかった。一方で、いずれの群においてもPLX3397によるミクログリアの減少が認められた。このことから、メチル水銀はミクログリアを増加させることなく記憶機能障害を惹起する可能性が考えられる。また、神経細胞体をNeuN抗体により免疫染色したところ、少なくとも記憶機能に関わる大脳皮質および海馬での神経細胞体はメチル水銀の影響をほとんど受けなかった。なお、神経細胞の樹状突起への影響は検討中である。以上のことから、メチル水銀は記憶機能に関わる海馬や大脳皮質において神経細胞死を誘導することなく記憶機能を低下させており、本作用にミクログリアが何らかの形で関与していることが示唆された。

IV 結論

メチル水銀は大脳皮質や海馬において神経細胞死を誘導することなくマウスに短期および長期の記憶機能障害を惹起すること、またこれらの障害にミクログリアが関与することが示唆された。メチル水銀はマウスの大脳皮質や線条体において神経細胞死を誘導することが報告されており、長期記憶の機能維持に関わる大脳皮質がメチル水銀によってダメージを受けていた可能性が考えられる。一方で、海馬の神経細胞は大脳皮質の神経細胞に比べてメチル水銀に対する感受性が低く、少なくとも海馬はメチル水銀による脳内損傷部位ではないとされてきた。しかし本研究では、主に海馬に依存する短期記憶機能もメチル水銀によって低下していたので、今後さらなる検討が必要である。

V 次年度以降の計画

前述のように、メチル水銀はミクログリアを増加させることなくマウスの短期および長期の記憶機能を低下させることが示唆された。今後、脳常在性ミクログリアのもつ傷害性 (M1型) ならびに保護性 (M2型) の極性転換などにメチル水銀が与える影響を検討することでメチル水銀による記憶機能障害へのミクログリアの関与様式を解明する。また、メチル水銀を投与したマウスの大脳皮質において神経細胞の樹状突起が短くなっていたことから、ミクログリアが神経細胞の樹状突起に損傷を与えることで記憶機能障害に関与する可能性が考えられる。ミクログリアに発現する補体C1qやC3などはミクログリアによるシナプスの刈り込みに関与することが知られており、これらの因子がメチル水銀による記憶機能障害に関与する可能性についても検討する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1) Lee JY Kim JM Noguchi T Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Deubiquitinase USP54

- attenuates methylmercury toxicity in human embryonic kidney 293 cells. *Fundam Toxicol Sci* 2022; 9:159-162.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. *Environ Health Prev* 2020; 25:30.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.

- 16) 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.
- 17) 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.

Microglial activation induced by exposure to low concentrations of methylmercury and its toxicological significance

Gi-Wook Hwang

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

Keywords: Methylmercury; Microglia

Abstract

Previously, we have shown that methylmercury can cause cell death by inducing the expression of various inflammatory cytokines in mouse neural stem cell lines. Furthermore, induction of inflammatory cytokine expression was observed in microglial cells derived from the brain of methylmercury-treated mice, and pretreatment of mouse brain slices with liposome-encapsulated clodronate, a microglia inhibitor, inhibited methylmercury-induced neuronal cell death. Herein, we examined the involvement of microglia in methylmercury-induced brain damage at the mouse level using behavioral analysis and immunohistochemistry. First, male C57BL/6N mice were exposed to methylmercury-containing water (20, 30, and 40 ppm) for 8 weeks, and a slight weight loss was recorded in the 40 ppm group when compared with that in the control group. Based on immunostaining of mouse brain tissues, the 30 ppm-exposed mice exhibited neuronal dendritic damage and microglial activation in the cerebral cortex; these effects were more pronounced in the 40 ppm-exposed mice than those in the 30 ppm-exposed mice. Furthermore, behavioral analysis of mice exposed to 30 ppm methylmercury for 6 to 8 weeks revealed that short- and long-term memory functions were impaired, while depressive-like behavior, sociability, impulsivity, and spontaneous locomotion remained predominantly unaltered. Notably, memory dysfunction was observed from week 6 of methylmercury exposure, although no significant damage to the neuronal cell body (mainly cell death) was observed under the same exposure condition. On mixing PLX3397, an inhibitor of colony-stimulating factor 1 receptor, with the diet, the number of microglia was reduced by approximately 30%, and methylmercury-induced short- and long-term memory dysfunctions were no longer observed. Overall, these results suggest that methylmercury induces memory dysfunction via microglial activation in the mouse brain.