

メチル水銀による末梢感覚神経障害とその回復の機構解析

主任研究者 篠田 陽

所属研究機関 東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室准教授

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、従来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きわめて不十分な状態にある。本研究は、前年度までの2期6年に渡る水俣病に関する総合的研究採択課題（研究代表者：鍛冶利幸、研究協力者：篠田陽、研究参加者：吉田映子）において明らかにした「メチル水銀(MeHg)による末梢感覚神経優位な神経障害と、痛覚の選択的障害およびその回復」について、そのメカニズムに迫る研究である。本研究内容は以下の4点に分けて推進する。①MeHg投与ラットの後根神経節(DRG)において、ミクログリア・マクロファージの集積が観察されていたが、この集積はDRGにおける神経細胞死の結果か、あるいはこの集積自体がDRGにおける神経細胞死を誘導・増悪しているのか。②MeHg投与ラットの刺激応答解析の結果、種々感覚モダリティ（痛・触・冷・温覚）の中でも痛覚のみが選択的に障害された。この痛覚選択性がどのようなメカニズムによって起こるのか。③痛覚障害は数十日の経過期間を経て回復し、同時に減少していたDRG神経細胞数もコントロールレベルまで増加することが観察されていたが、これは神経新生が起こっているのか。④そしてその神経新生がどのような細胞から、どのようなメカニズムで起こるのか。これら4点について明らかにすることで、MeHgによる末梢感覚神経障害とその回復についての細胞生物学的・分子生物学的基盤を確立する。

キーワード： 末梢神経障害、感覚神経、後根神経節（DRG）、炎症応答、神経新生

研究分担者

吉田 映子・電力中央研究所生物・環境化学研究部門（主任研究員）

研究協力者

鍛冶 利幸・東京理科大学薬学部薬学科（嘱託教授）

研究参加者

高橋 勉・東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室（講師）

I 研究目的

昨年度までの 6 年間で本助成事業の支援により得た研究成果により、MeHg の運動神経と比した感覚神経における選択的毒性発現は、MeHg の細胞内取込と排出に関連する LAT-1 および MRP-2 の発現レベルの差が寄与し得ること、細胞死関連シグナルとして、TNF- α および TLR 経路が活性化すること¹⁾、MeHg 投与により DRG へのミクログリアとマクロファージの集積が見られること²⁾、痛覚が特異的に障害され、その障害は経時的に回復すること³⁾などを見出した。本研究目的はこれら研究成果を踏まえ、MeHg による感覚神経における毒性発現およびその病態をより詳細に解明することにある。そのため本研究では①ミクログリア・マクロファージ集積の末梢感覚神経障害に対する因果関係 (1・2 年目)、②痛覚特異性の分子基盤 (1・2 年目)、③④回復期における神経新生の実態とその機構 (2・3 年目)の解明を目指す。本研究の成果は末梢感覚神経における MeHg 毒性発現機構を明らかにするのみならず、これまであまり議論されてこなかった種々感覚モダリティに対する MeHg 毒性発現の差異や感覚障害の経時回復について新たな知見が得られると考えられ、水俣病の末梢神経障害の理解に貢献するだけでなく、その経年診断にも重要な貢献が期待できるものとする。本年は初年度であるため、上記計画の中で①ミクログリア・マクロファージ集積の末梢感覚神経障害に対する因果関係 (1・2 年目)、②痛覚特異性の分子基盤 (1・2 年目)について遂行した。

II 材料と方法

1. メチル水銀およびミノサイクリン投与

東京実験動物より購入した Wistar Rat (9 週齢・オス) 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 1 週間または 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。ミノサイクリン投与は上述のスケジュールにおいて、塩化メチル水銀水溶液投与 1 時間前に 30 mg/kg/day で腹腔内投与を行った。

2. DRG の組織学的解析

メチル水銀投与したラットを投与開始 7, 14, 28, 42, 56, 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。脳および腰椎 (L4-L5) より後根神経節(DRG), 感覚神経繊維, 運動神経繊維を摘出し、4% PFA / 0.1 M PB 溶液で一昼夜後固定し、20% sucrose / PBS 溶液に一昼夜置換後 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、常法に従って蛍光免疫組織化学染色を行った。染色した切片は蛍光顕微鏡により撮影し、得られた写真を用いて DRG の面積あたりの染色細胞数を ImageJ ないし視認による計数を行い、定量評価した。

3. DRG の培養と神経細胞死の評価

DRG 神経細胞（感覚神経）は、4 週齢の雄 Wistar Rat の胸椎から仙椎を摘出して得た。神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し、10% FBS-DMEM にて 7 日間培養した後、実験に使用した。メチル水銀は 1% BSA-DMEM を用いて 0.25, 0.5, 1, 3 および 5 μM に調製し、TNF- α は 20 ng/mL に調製し曝露した。TNF 受容体のアンタゴニストである WPQ9Y (20 μM) は DRG に 1 時間前処理した後、メチル水銀を 24 時間曝露した。細胞生存率については Cell Counting Kit-8 (Dojindo) にて評価した。

（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薬科大学（承認番号 P22-70）および電力中央研究所（承認番号 1003155）の動物委員会で承認されたものであり、承認された内容に沿って、法令および動物実験倫理規定に沿って適切に研究を実施した。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、東京薬科大学環境安全規定および電力中央研究所安全衛生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. ミクログリア・マクロファージ活性抑制による、MeHg 誘発性神経細胞死への影響

①のミクログリア・マクロファージ集積の末梢感覚神経障害に対する因果関係を調べる目的で、MeHg 投与と同時にミクログリア・マクロファージ抑制剤であるミノサイクリンを投与した。投与開始 14 日目に灌流固定し、脳および DRG の凍結標本を作成した。現在 DRG におけるミクログリア・マクロファージおよび神経細胞の数について定量評価を行っている。

2. MeHg 曝露による神経細胞死の経時的定量評価

DRG における神経細胞数についてはこれまで、コントロール切片に加えて投与開始 7, 14, 70 日の標本における解析結果しか存在しなかった。その間の詳細な時系列変化を観察する目的で、投与開始 28, 42, 56 日の標本も作成し、神経細胞数を神経細胞マーカーである NeuN で染色し定量評価したところ、投与開始 42-56 日目付近より神経細胞数の増加が認められた。

3. MeHg 曝露による DRG へのミクログリア・マクロファージ集積の経時的定量評価

DRG におけるミクログリアおよびマクロファージ集積の神経細胞死への影響を考察する目的で、両細胞の経時的・量的変化を計測した。ミクログリア・マクロファージマーカーである Iba1 で染色し定量評価したところ、投与開始 14-28 日で Iba1 陽性細胞数の有意な増加が認められ、投与開始 70 日までその増加は持続した。一方マクロファージマーカーである

CD68 で染色し定量評価したところ、投与開始 14-28 日で一過性かつ有意な陽性細胞の増加が認められたものの、その後急峻に数を減らし、コントロールレベルと同等になった。

4. 痛覚特異的鈍麻と回復の組織学的解析

DRG には様々な感覚モダリティ情報を担当する神経細胞が個々に存在するが、近年これらの細胞をその遺伝子発現パターンにより 11 種類に分類できることを示した研究が報告された⁴⁾。この分類法を組織学に適用して解析するために、現在種々抗体を用いた個別の末梢感覚神経細胞の同定とその MeHg 依存的な神経細胞死の定量化を進めており、これまでに少なくとも 4 種類の神経細胞を免疫組織化学的に同定可能であることを見出している。

5. 神経新生の組織学的解析

MeHg 傷害の回復期において神経新生が起こっているかどうかについて、DRG サンプル調製の 1 週間前から 5 日間、毎日 BrdU を投与した上で灌流固定、DRG 凍結切片を作成し、神経細胞他のマーカー抗体で染色して、BrdU 陽性神経細胞が観察されるかを検討したところ、BrdU 陽性細胞は観察されたものの、BrdU 陽性神経細胞は観察されなかった。

6. DRG の培養と神経細胞死の評価

メチル水銀による感覚神経優位な傷害に、マクロファージから放出される TNF- α が関与するかどうかを明らかにする目的で、DRG を種々濃度の TNF- α で単独処理を行なったが、顕著な細胞死は認められなかった。また、TNF- α とメチル水銀を同時に処理しても、TNF- α はメチル水銀による DRG への細胞傷害に影響を与えなかった。さらに、DRG を TNF 受容体アンタゴニスト WP9QY で前処理しても、メチル水銀による神経傷害は軽減されなかった。現在、ラットマクロファージ様株化細胞 HS-P を用いて、メチル水銀による DRG 細胞傷害に関わるメカニズムを検討中である。

IV 考察

ミクログリア・マクロファージの増殖・活性化が MeHg による末梢感覚神経細胞死に与える影響について、ミノサイクリンを投与することによるミクログリア・マクロファージ活性抑制による神経細胞死の定量評価についてはサンプル調製まで遂行した。ミクログリアおよびマクロファージ数、神経細胞数の詳細な経時変化は既に解析を終えており、それぞれ特徴的な数的経時変化をしていることを明らかにしている。ミノサイクリン投与実験の結果と総合することで、ミクログリア・マクロファージによる神経細胞死やその後の数的回復に対する影響を評価することが可能であると考えられる。また、刺激応答解析により得られた痛覚特異的鈍麻の組織学的評価については、免疫組織化学的な細胞同定が進行中であり、同定可能となった細胞群の数的変動について定量解析を進めていく予定である。また、痛覚特異的鈍麻の別の評価法として *in vitro* における MeHg 感受性評価も並行して進めつつ、その分

子メカニズムを明らかにするためにウェットな実験系（セルソーティングと次世代シーケンサーによるキーファクター同定、ICC による細胞とキーファクターの同時染色など）およびドライな解析系（遺伝子パターン解析⁴⁾に公開されている遺伝子データベースからのキーファクター推定など）を組み合わせつつ遂行する。神経新生の実態については、神経新生が実際に起きているかどうかについて、今回の BrdU 投与条件では明らかにできなかったため、BrdU の投与時期をより後期の期間にシフトさせる、あるいは BrdU をより検出感度の高い EdU に変更するなど、工夫が必要であると思われる。神経新生機構については、アデノ随伴ウイルスによる DRG 神経細胞および神経幹細胞候補細胞へのマーカー導入による、新生神経からの軸索動員のイメージング解析、神経新生の起源細胞の同定およびその組織学的解析を視野に入れ、これまでに AAV9-CBh-pal-Venus-Akaluc, AAV9-CBh-pal-Venus-Akaluc-Kpre, AAV9-CBh-Venus-Akaluc-Kpre, AAV6-CBh-mGfap-Cre, AAV6-FLEX-GFP をそれぞれ作成し、現在遺伝子導入—解析実験を進めている。

V 結論

本年は本申請研究初年度であり、次年度にむけたミクログリア・マクロファージの神経細胞死への影響についての解析、痛覚特異的鈍麻の組織学的解析およびその分子メカニズム、神経新生動体解析についての技術的な準備は概ね進捗したと考える。次年度はこれらの技術を用い、具体的な定量解析および分子メカニズム同定に迫る。

VI 今後の課題

今回ミクログリア・マクロファージの活性抑制剤としてミノサイクリンを用いたが、同様の作用を持つ他の抑制剤（レスベラトロールや ADP 受容体阻害剤など）によるパラレルな検証も今後必要になる可能性がある。痛覚特異的鈍麻についてはヒトでは特異的に観察されないものであることから、これが種特異的なものであるのか、検出系の感度によるものかについては不明であるため、組織学的解析を慎重に進めつつ検証すべき課題であると考ええる。組織学的解析は免疫染色による定量解析が思っていた以上に困難を究めており、特異的な細胞同定に時間を要している。少しずつ解決はしているが、今後もこの領域には注力する必要があると思われる。神経新生の研究については種々 AAV ベクターを作成しているが、このベクターが唯一解ではないため、順次可能性のあるものについてベクターを開発していく必要があると考える。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1) Yo Shinoda*, Masahiro Akiyama, and Takashi Toyama. *Biol. Pharm. Bull.* (2023) *in press*. Potential association between methylmercury neurotoxicity and inflammation.

引用文献

- 1) Shinoda Y, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, Kaji T, Fujiwara Y. Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats. *J. Toxicol. Sci.*, **44**, 549-558 (2019).
- 2) Shinoda Y, Ehara S, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, Kaji T, Fujiwara Y. Methylmercury-induced neural degeneration in rat dorsal root ganglion is associated with the accumulation of microglia/macrophages and the proliferation of schwann cells. *J. Toxicol. Sci.*, **44**, 191-199 (2019).
- 3) Shinoda Y, Yamada Y, Yoshida E, Takahashi T, Tsuneoka Y, Eto K, Kaji T, Fujiwara Y. Hypoalgesia and recovery in methylmercury-exposed rats. *J. Toxicol. Sci.*, **46**, 303-309 (2021).
- 4) Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell rna sequencing. *Nat. Neurosci.*, **18**, 145-153 (2015).

英文要約 (Abstract)

Since Minamata disease is a central nervous system disorder known as Hunter-Russell syndrome, research on the mechanism of methylmercury toxicity has been conducted mainly on the central nervous system. However, research on peripheral neuropathy, especially injury with a predominance of sensory nerves, which was observed in the early stages of Minamata disease, has been extremely insufficient. This study is research to investigate the mechanism of "methylmercury-induced peripheral sensory nerve damage, selective impairment of pain perception, and its recovery" which was clarified in the six-year comprehensive research project on Minamata disease (Principal Investigator: Toshiyuki Kaji, Research Collaborator: Yo Shinoda, Research Participant: Eiko Yoshida) until the previous fiscal year. This research is a study to investigate the mechanism. This research will be divided into the following four areas. (1) In the dorsal root ganglion (DRG) of MeHg-treated rats, accumulation of microglia and macrophages was observed, but is this accumulation a result of neuronal cell death in the DRG, or does this accumulation itself induce or exacerbate neuronal cell death in the DRG? (2) Stimulus response analysis of MeHg-treated rats showed that among the various sensory modalities (pain, touch, cold, and warmth), only pain was selectively impaired. What is the mechanism of this pain selectivity? (3) The pain sensation was restored after several tens of days of treatment, and at the same time, the number of DRG neurons, which had been decreased, was observed to increase to the control level. (4) And from what kind of cells and by what mechanism does this neurogenesis occur? By clarifying these four

points, we will establish the cellular and molecular biological basis for MeHg-induced peripheral sensory neuropathy and its recovery.