

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（東北大学大学院薬学研究科准教授）

研究要旨

これまで我々は、メチル水銀によって転写関連因子tmRT1を介して発現誘導されたオノスタチンM（OSM: IL-6分子種の一員）が、細胞外に放出された後にTNF受容体3（TNFR3）結合することで細胞死を誘導する可能性を示してきた。また、メチル水銀がマウス脳内のミクログリアにおいてOSMの発現を誘導することや、TNFR3中和抗体のマウスの脳室内または脳組織スライスへの添加がメチル水銀による神経細胞死を抑制することを見出している。そこで本年度では、ミクログリアにおけるメチル水銀によるOSMの発現誘導機構、メチル水銀による脳神経損傷におけるOSMとTNFR3の関係、および、メチル水銀によるTNFR3経路を介した神経細胞死誘導機構について検討した。

tmRT1欠損マウスから調製した初代ミクログリアをメチル水銀で処理した結果、OSMの発現誘導が一部低下したことから、ミクログリアでのOSMの発現誘導にはtmRT1に加えて他の転写因子も関与する可能性が示唆された。そこで、siRNAを用いた遺伝子ノックダウンにより、STAT3がメチル水銀によるOSMの発現誘導に関与することを見出した。このSTAT3はメチル水銀によって活性化されることが初代ミクログリアおよびマウス脳組織スライスにおいて認められた。また、tmRT1はメチル水銀によってOSMプロモーター上に存在するSTAT3結合配列の近辺にリクルートされることが示唆された。以上のことから、メチル水銀はミクログリアにおいてtmRT1およびSTAT3を活性化させることによってOSMの発現を誘導することが示唆された。また、TNFR3に対する*in situ* hybridizationを行った結果、TNFR3はメチル水銀による神経損傷が認められる大脳皮質や線条体付近の神経細胞で発現している可能性が示唆された。さらに、マウス大脳皮質スライスにOSMまたはTNFR3に対する中和抗体を添加したところ、メチル水銀によるシナプスマーカー蛋白質の減少がそれぞれ抑制され、OSMおよびTNFR3両方の中和抗体を添加しても単一抗体添加以上の抑制作用は認められなかった。このことは、ミクログリアから放出されたOSMがTNFR3に結合することによって神経細胞死を惹起する可能性を示唆している。TNFR3の細胞内ドメインに結合してシグナル伝達に関わる因子としてTRAF2、TRAF3およびTRAF5が知られている。これらの因子をそれぞれ発現抑制したところ、TRAF2またはTNFR5の発現抑制細胞はメチル水銀耐性を示したが、両発現抑制細胞においてもTNFR3発現抑制によるメチル水銀耐性獲得が認められた。そこで、TNFR3に結合してメチル水銀による細胞死に関わる未知因子を同定するために免疫沈降および二次元電気泳動を行ったところ、TNFR3に結合することで細胞死誘導に関わる候補蛋白質が多数同定されており、それらのメチル水銀毒性発現への関与について検討中である。

以上のことから、メチル水銀は脳内ミクログリアでのtmRT1およびSTAT3の活性化を介し

てOSM産生を促進し、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上のTNFR3に結合することで未知のシグナル伝達系を介した細胞死を誘導していると考えられる。

キーワード：メチル水銀、オンコスタチンM (OSM)、TNFR3、神経細胞、ミクログリア
研究者協力者
外山喬士（東北大学大学院薬学研究科助教）

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。我々はヒト由来培養細胞を用いた網羅的遺伝子スクリーニングによって、細胞のメチル水銀感受性に影響を与える転写関連因子としてtmRT1を同定した。また、このtmRT1を介してメチル水銀によって発現誘導され、かつメチル水銀毒性増強に関わる遺伝子産物としてオンコスタチンM (OSM) も同定した。OSMはIL-6分子種の一員として造血や免疫、細胞増殖などにおいて重要な役割を果たすサイトカインである。これまでの培養細胞を用いた検討により、メチル水銀がtmRT1を介してOSMを発現誘導し、細胞外に放出されたOSMが細胞膜上に存在するTNF受容体3 (TNFR3) に結合することでメチル水銀毒性を増強していることを明らかにしている。また、メチル水銀はOSMの転写促進およびプロテアソームによる分解抑制の2つの作用を介してOSM蛋白質レベルを増加させることが示唆されている。さらに、マウス脳内でのメチル水銀によるOSMの発現誘導には主にミクログリアが関与していることが判明し、同様の結果がマウス脳組織スライス培養系においても得られている。TNFR3中和抗体のマウス脳室内への投与、または、マウス脳組織スライスへの添加がメチル水銀による神経細胞死を抑制したことから、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。しかしながら、メチル水銀によるOSMの発現誘導機構には不明な点が多く、また、TNFR3を介した神経細胞死誘導機構も未だ不明である。そこで本年度では、(1) ミクログリアにおけるメチル水銀によるOSMの発現誘導機構、(2) メチル水銀による脳神経損傷におけるOSMとTNFR3の関係および(3) メチル水銀によるTNFR3経路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. マウス初代ミクログリア細胞の調製

生後2日齢のマウス3匹を氷冷後、大脳皮質を摘出し、4 mL 0.01% Trypsin 溶液中でピペッティングにより細かく破碎した後、37°Cで消化反応を行った。15分後、10% FBS 含有DMEM (以下DMEMと表記する) を4 mL 添加・懸濁し、1,000 gで5分間遠心分離した。上清を除去した後、10 mL DMEMで懸濁し、再度同様の条件で遠心分離を行った。上清を除去後、10 mL DMEMに再懸濁し、40 µm cell strainerを通してシングルセルのみを分取した。分取した細胞懸濁液を、10 cm dishにまんべんなく広げ培養を開始した。培養開始後3

日おきに培地を全量交換し、15日まで培養を続けた。15日後、培地で細胞表面を弱くピペッティングすることで剥がれてきた細胞を、1,000 g、5分間遠心分離し、上清を除去後、沈殿を1 mLのDMEMで再懸濁し細胞数の計測を行った。続いて、ポリ-D-リジンでコートされた12 well plateに 1×10^5 cells/well/mLとなるように細胞を播種し、24時間後の細胞を初代ミクログリアとして利用した。

2. マウス由来ミクログリア (BV-2) 細胞株において NF- κ B、AP-1 または STAT3 のノックダウンがメチル水銀による OSM の発現誘導に与える影響

BV-2細胞は 2.5×10^5 cells/wellになるように12-well plateに播種した。24時間培養した後、Lipofectamine RNAiMAXを用いてNF- κ B (RelA)、AP-1 (cJun) およびSTAT3に対するsiRNAをそれぞれ導入し、メチル水銀で処理した。培養終了後Isogen IIにより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. C17.2 細胞において TNFR3 および TRAF 分子種のノックダウンがメチル水銀による細胞死に与える影響

Lipofectamine RNAiMAXを用いてTNFR3、TRAF2、TRAF3 およびTRAF5に対するsiRNAを導入したマウス由来神経幹細胞(C17.2細胞)を 1×10^3 cells/wellになるように96-well plateに播種した。48時間培養した後、メチル水銀で24時間処理した。培養終了後、AlamarBlueアッセイにより細胞死を評価した。

4. マウス大脳皮質のスライス培養

日齢7日のマウス(C57BL/6)から全脳を取り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質のみを摘出した。得られた大脳皮質はMcILWAIN tissue chopperを用いて350 μ m幅に切断し、氷上においてdissociation buffer中で30分静置した。その後、大脳皮質スライスを組織培養培地中の培養用プレートの上で培養した。翌日に培地を交換し、4日後からメチル水銀で処理した。

5. TNFR3 および OSM に対する中和抗体がメチル水銀による神経細胞の減少に与える影響

マウス大脳皮質スライスの培養培地中にTNFR3 およびOSM中和抗体(1 μ g/ml)を添加し、さらに、所定濃度のメチル水銀で培養し、その後、4% paraformaldehydeを用いて固定した。次に、神経細胞マーカーであるNeuNに対する抗体を用いて免疫染色を行った後に、DAPI(核染色剤)入りのVECTASHIELD mounting mediumにて封入し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡(FV-1000)でNeuN陽性細胞数をカウントした。

6. 川本法による脳組織の免疫染色

マウス(C57BL/6)から全脳を取り出し、専用の包埋剤(SCEM)で包埋した後ドライアイスで冷却したヘキサン中で凍結した。クライオスタットにて、 -18°C で切片支持用粘着フィ

ルム (Cryofilm type IIC(10)) を脳組織の薄切面に貼り付けた後、脳組織切片を作製した。切片を 100%エタノールで洗浄し、4% paraformaldehyde または氷冷メタノールで固定した。次に 0.3% Triton X-100 および 10% Goat serum 含有リン酸バッファーで膜透過処理およびブロッキングを行い、TNFR3 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。続いて DAPI 入りの VECTASHIELD mounting medium にて封入し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (FV-1000) で観察した。

7. メチル水銀により TNFR3 にリクルートされるエフェクター分子の探索

HEK293 細胞は 6.0×10^6 cells/dish になるように 10 cm dish に播種した。24 時間培養した後、Polyethylenimine を用いて C 末端に V5 タグを付加した TNFR3 を発現させるプラスミドベクターを導入した。24 時間培養した後、20 μ M のメチル水銀で 6 時間処理した。培養終了後 Cell-LyEX MP により蛋白質を回収し、抗 V5 タグ抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った。次に、V5 タグペプチドにより抗 V5 タグ抗体ビーズから蛋白質を溶出し、TCA/アセトンを用いて蛋白質を沈殿させた後、サンプルバッファー (8M Urea, 50 mM DTT, 2% CHAPS, 0.2% バイオライト (pH3-10)、0.001% BPB) に溶解した。固定化 pH 勾配ストリップゲル (pH3-10) で等電点電気泳動を行った後、平衡化バッファー I (6M Urea, 2% SDS, 0.375M Tris-HCl (pH8.8), 2% DTT) および平衡化バッファー II (6M Urea, 2% SDS, 0.375M Tris-HCl (pH8.8), 2.5% ヨードアセトアミド) で平衡化した。その後 12.5% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、電気泳動終了後のゲルを銀染色法により染色した。

(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、東北大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北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) ミクログリアにおけるメチル水銀による OSM の発現誘導機構

上述のように培養細胞を用いた検討により、転写関連因子である tmRT1 がメチル水銀による OSM の発現誘導に関与していることを見出している。そこで、tmRT1 欠損マウスから調製した初代ミクログリアをメチル水銀で処理したところ、メチル水銀による OSM の発現誘導が野生型と比較して一部低下した。このことから、ミクログリアにおいても tmRT1 はメチル水銀による OSM の発現誘導に関与していることが示唆された。しかし、tmRT1 欠損だけではメチル水銀による OSM の発現誘導が完全に抑制されなかったため、他の転写因子の関与も示唆された。OSM の発現誘導に関わる既知の転写因子として NF- κ B、AP-1 および STAT3 が知られている。そこで、遺伝子ノックダウンが容易なマウス由来ミクログリア細胞株である

BV-2細胞を用いて、当該転写因子に対するsiRNA をそれぞれ導入した結果、STAT3の発現抑制によってメチル水銀によるOSMの発現誘導が低下した。また、BV-2細胞、初代ミクログリアおよびマウス脳組織スライスにおいてメチル水銀によるOSMの発現誘導時にSTAT3が活性化されていた。さらに、STAT3の活性化に必要な上流のキナーゼであるJAK1の発現を抑制してもメチル水銀によるOSMの発現誘導が低下した。これらのことから、メチル水銀はJAK1/STAT3経路を活性化させることでOSMの発現を誘導することが示唆された。また、OSM遺伝子転写開始点から上流280 ~ 301 bpにSTAT3の結合配列が存在しており、本配列付近を欠失させることによってメチル水銀によるtmRT1のOSM遺伝子プロモーターへの結合がほとんど認められなくなった。このことは、メチル水銀によるOSMの発現誘導においてtmRT1およびSTAT3が何らかの形で相互に影響しあう関係にある可能性を示唆するものである。

(2) メチル水銀による脳神経損傷におけるOSMとTNFR3の関係

これまでの検討により、メチル水銀投与マウスの脳内において、ミクログリアで合成誘導された後に細胞外に放出されたOSMがTNFR3の細胞外ドメインに結合することで神経細胞死を惹起する可能性が示唆されている。そこで、TNFR3に対する*in situ* hybridizationを行ったところ、TNFR3発現陽性細胞が脳全体的に広く分布しており、特にメチル水銀による神経損傷が認められる大脳皮質や線条体などで多く認められた。また、脳内でTNFR3を発現する細胞を免疫染色により調べた結果、TNFR3陽性細胞は、少なくともアストロサイトのマーカーであるGFAPおよびミクログリアマーカーであるIba1による染色像とはほとんど重ならなかった。したがって、脳内でTNFR3を発現する細胞のほとんどが神経細胞であると考えられることから、神経細胞マーカー (NeuN等) による二重染色を行っている。一方、市販されている5種のTNFR3抗体を用いて様々な条件下で免疫染色も行っているが、その発現の観察までには至っていない。次に、OSMに対する中和抗体を用いて、メチル水銀によってミクログリア外に放出されたOSMと神経細胞損傷の関係を調べた。その結果、マウス大脳スライスをメチル水銀で処理することによって神経シナプスマーカーであるシナプトフィジンのレベルが減少したが、この減少はOSM中和抗体の添加によって抑制された。また、TNFR3中和抗体によってもメチル水銀によるシナプトフィジンのレベルの減少は抑制されたが、OSMおよびTNFR3の両方の中和抗体を添加してもそれぞれの中和抗体による抑制作用以上の効果は認められなかった。このことから、ミクログリアから放出されたOSMがTNFR3に結合することでメチル水銀による神経細胞損傷に関与する可能性が示唆された。

(3) メチル水銀によるTNFR3経路を介した神経細胞死誘導機構

上述のように、メチル水銀によって細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上に存在するTNFR3の細胞外ドメインに結合することで細胞死を誘導する可能性が示唆されている。TNFR3の既知リガンドであるLIGHTがTNFR3の細胞外ドメインに結合するとその細胞内ドメインにTRAF分子種 (TRAF2、TRAF3、TRAF5) がリクルートされ細胞内にシグナルを伝

達することで細胞死を誘導することが知られている。そこで、マウス由来神経幹細胞であるC17.2細胞中のTRAF2、TRAF3およびTRAF5の発現をそれぞれ抑制させたところ、TRAF3の発現抑制細胞は対照細胞と同程度のメチル水銀感受性を示したのに対し、TRAF2またはTRAF5の発現抑制細胞はメチル水銀耐性を示した。しかし、両発現抑制細胞においてもTNFR3発現抑制によるメチル水銀耐性獲得作用が認められた。これらのことから、メチル水銀によるTNFR3を介した細胞死誘導には少なくともTNFR3にリクルートされる既知のTRAF分子種が関与することなく他の因子が関与していると考えられる。そこで、メチル水銀によって活性化されるTNFR3に結合する未知の蛋白質を検索するために、TNFR3のC末端にV5タグを融合したTNFR3-V5を発現するプラスミドをC17.2細胞に導入した。しかし、本細胞はその増殖が非常に遅くTNFR3-V5の発現も低かったことから、TNFR3結合蛋白質の検索にはC17.2細胞と同様にメチル水銀によるTNFR3を介した細胞死が認められるHEK293細胞を用いることにした。メチル水銀によるOSM発現誘導が認められる20 μ Mのメチル水銀でTNFR3-V5発現HEK293細胞を6時間処理し得られた抽出物を用いてV5抗体による免疫沈降と二次元電気泳動を行ったところ、TNFR3-V5に結合する複数の蛋白質が同定された。今後、これらの候補因子とTNFR3を介した細胞死との関わりを詳細に検討することで、TNFR3を介した新規細胞死誘導機構が明らかになると期待される。

IV 結論

これまでの研究成果を総括すると、メチル水銀は脳内のミクログリアにおいてtmRT1およびSTAT3の活性化を介して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に結合することで未知経路を介して細胞死を惹起することが示唆された。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傷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と期待される。

V 次年度以降の計画

上述のように、OSM/TNFR3経路を介したミクログリア/神経細胞のクロストークがメチル水銀による中枢神経傷害に関わる重要な分子機構である可能性が示唆された。今後、TNFR3ノックアウトマウスを作製してメチル水銀毒性発現におけるOSM/TNFR3経路の役割を詳細に検討することでメチル水銀が示す中枢神経傷害に関わる分子機構の解明を目指す。また、TNFR3に結合する蛋白質の中から、メチル水銀によるTNFR3を介した細胞死誘導に関わる因子を特定し、その役割を明らかにすることでOSM/TNFR3経路を介した神経細胞死誘導機構の全容解明を目指す。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1) Toyama T 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.

2) 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.

3) 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: 4631.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) Iwai-Shimada M Takahashi T Kim MS Fujimura M Ito H Toyama T Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces the expression of TNF- α selectively in the brain of mice, *Sci Rep* 2016; 6: 38294.

13) Hwang GW Fukumitsu T Ogiwara Y Takahashi T Miura N Kuge S Naganuma A. Whi2 enhances methylmercury toxicity in yeast via inhibition of Akr1 palmitoyltransferase activity,

Biochim Biophys Acta 2016; 1860: 1326-133.

14) Lee JY Ishida Y Takahashia T Naganuma A Hwang GW. Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity, *Sci Rep* 2016; 6: 21518.

15) Ogiwara Y Miura N Kuge S Naganuma A Hwang G.W. Overexpression of palmitoyl transferase HIP14 confers resistance to methylmercury in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Fundam Toxicol Sci* 2016; 3: 75-77.

16) Toyama T Hwang GW Naganuma A. Citrulline enhances methylmercury toxicity in HEK293 and C17.2 cells, *Fundam Toxicol Sci* 2015; 2:229-231.

17) Toyama T Hwang GW Naganuma A. Metabolomic analysis of low molecular weight substances released into medium from HEK293 cells treated with methylmercury, *Fundam Toxicol Sci* 2015; 2: 227-228.

18) Toyama T Murakami S Kuge S Hwang GW Naganuma A. Methylmercury induces release of a cytotoxic factor from HEK293 cells into medium, *Fundam Toxicol Sci* 2015; 2: 223-226.

19) Lee JY Ishida Y Kuge S Naganuma A Hwang GW. Identification of substrates of F-box protein involved in methylmercury toxicity in yeast cells, *FEBS Lett* 2015; 589: 2720-2725.

20) Iwai-Shimada Yamashita M Kurokawa N Nakai K Ishida M Naganuma A Satoh H. Effect of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral development in male mice: comparison between methylmercury in fish and methylmercury chloride added to diets, *Fundam Toxicol Sci* 2015; 2: 67-78.

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

Gi-Wook Hwang

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University, Sendai 982-8578, Japan*

Keywords: Methylmercury; TNF receptor 3; Oncostatin M; Central nervous cell; Microglia

Abstract

We recently reported that oncostatin M (OSM), which was induced by methylmercury and bound to the extracellular domain of TNF receptor 3 (TNFR3) that leading to cell death. We also found that methylmercury induces OSM expression in microglia in the mouse brain. In this study, we examined the mechanism involved in methylmercury-induced OSM expression in microglia, the relationship between OSM and TNFR3 in neuronal damage caused by methylmercury, and the mechanism related to methylmercury-induced neuronal cell death through the TNFR3 pathway.

Exposure of primary microglia, which prepared from tmRT1-deficient mice, to methylmercury partially reduced the induction of OSM expression, suggesting that other transcription factors in addition to tmRT1 may be involved in the induction of OSM expression by methylmercury in microglia. We also found that knockdown of STAT3, a transcription factor, suppressed induction of OSM expression by methylmercury. STAT3 was activated by methylmercury in primary microglia and mouse brain tissue slices. *In situ* hybridization for TNFR3 also suggested that TNFR3 possibly expressed in neurons. When a neutralizing antibody against OSM or TNFR3 was added to mouse cerebral slices, the reduction of synaptic marker proteins caused by methylmercury was suppressed, and no further reduction was observed by addition of both antibodies. This suggests that OSM released from microglia may cause neuronal cell death by binding to TNFR3. TRAF2, TRAF3 and TRAF5 are known as factors involved in signal transduction by binding to the intracellular domain of TNFR3. However, these factors were not involved in methylmercury-induced cell death via TNFR3. Recently, we identified some candidate proteins that bind with TNFR3 by methylmercury using LC/MS, and their involvement in the methylmercury toxicity is under investigation. These results suggest that microglial-neuronal crosstalk through the OSM/TNFR3 pathway may be an important mechanism involved in methylmercury-induced central nervous system injury.