

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

これまでに我々は、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で、メチル水銀による神経細胞死が抑制されることを報告してきた。また、メチル水銀含有水（メチル水銀として約24 ppm）に8週間曝露したマウスにおいて、短期および長期の記憶が障害されていることを見出した。そこで本研究では、メチル水銀が惹起する記憶障害への炎症性サイトカインおよびミクログリアの関与を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、マウスにメチル水銀含有水を経時的（2、4、6週間）に曝露したところ、6週目においてマウスの短期および長期の記憶障害が認められた。また、免疫組織染色により曝露4週目に前頭葉においてミクログリアが増加し、また6週目では頭頂葉においてもその増加が認められた。一方、神経細胞は曝露開始から6週目に前頭葉において僅かに減少し、頭頂葉では減少傾向を示した。なお、海馬中の神経細胞およびミクログリアはメチル水銀の影響を受けなかった。興味深いことに、本曝露条件下では炎症性サイトカイン群の発現誘導は認められなかったことから、前頭葉や頭頂葉においてメチル水銀は、炎症性サイトカインの発現を誘導することなくミクログリアの活性化を介して記憶障害を惹起することが示唆された。最近我々は、X遺伝子欠損マウス（遺伝子名未公開；LMAマウス）においてマクロファージ活性は変動することなく、ミクログリア活性のみが著しく低下していることを偶然見出した。LMAマウスにメチル水銀を8週間曝露したところ、前頭葉や頭頂葉でのメチル水銀によるミクログリアの増加や錐体細胞の先端樹状突起の損傷がほとんど観察されず、また記憶障害も大幅に改善された。以上のことから、メチル水銀はミクログリアの活性化を介して錐体細胞に損傷を与えることで記憶障害を惹起す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）

山下 直哉（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（OSM）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報告している。一方、マウス脳スライスを低濃度の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。昨年度までの検討では、マウスの体重増加に影響を与えない塩化メチル水銀含有飲水（終濃度30 ppm; メチル水銀として約24 ppm）を8週間曝露したマウスにおいて短期および長期の記憶障害が惹起することを見出している。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記憶障害における炎症性サイトカインおよび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曝露

5-6週齢の雄性C57BL/6Nマウス並びにlow microglial activity (LMA) マウス (X遺伝子欠損マウス) 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、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、固形飼料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30 ppmの塩化メチル水銀含有水を6-7週齢の雄性マウスに2~8週間自由摂取させた。コントロール群には、還元型グルタチオンのみ (塩化メチル水銀投与群と等量) を含む水道水に溶解させた飲料水を同期間摂取させた。

2. Y-maze test (短期記憶の評価)

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。

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

3. Novel object recognition test (長期記憶の評価)

Novel object recognition test (NOR) テストは、プラスチックケージ (縦24 cm × 横17 cm × 高さ12 cm) 内で実行した。実験は3日連続して午前10時から午後2時の間に行った。1日目にマウスをケージ内で自由に10分間探索させた。2日目に形の異なる2つのオブジェクトを等間隔に配置してマウスに10分間探索させた (sample phase)。24時間後、馴染みのあるオブジェクトのうち1つを新しい形のオブジェクトに差し替えてマウスに10分間探索させた (test phase)。各セッションはカメラで撮影し、両オブジェクトの探索時間を分析した。2日目 (D2) および3日目 (D3) の識別指数は、次の式で計算した。

$$D2 = \frac{(\text{exploration time on right object} - \text{exploration time on left object})}{\text{total exploration time for two identical objects}}$$

$$D3 = \frac{(\text{exploration time on novel object} - \text{exploration time on familiar object})}{\text{total exploration time for the novel and familiar identical objects}}$$

4. 脳組織を用いた蛍光染色

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。固定した脳組織は、NeoLinearSlicer-AT（堂阪イーエム）を用いて脳切片（100 μ m スライス）を作製した。得られた脳スライスは PBS で 15 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。PBS で 15 分おきに 2 回洗浄し、1% NGS-in PBS で 1000 倍希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。サンプルを PBS で 30 分おきに 4 回洗浄後、1% NGS-in PBS で 500 倍希釈した二次抗体および DAPI（0.5 μ g/mL）と遮光下 4°C で一晩反応させた。PBS で 30 分おきに 4 回洗浄後、退色防止用封入剤 SlowFade™ diamond antifade mountant（Invitrogen、S36972）を滴下し、カバーガラスで封入した。免疫蛍光は C2 confocal microscope system（Nikon）を用いて可視化させた。なお、本実験に使用した一次抗体および二次抗体は下記の通りである。

一次抗体

- Anti Iba1 antibody（Fujifilm Waco、019-19741）
- Anti NeuN antibody（Sigma-Aldrich、MAB377）
- Anti MAP2 antibody（Cell Signaling Technology、#4542）

二次抗体

- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG（Invitrogen、A11001）
- Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG（Invitrogen、A11008）
- Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG（Invitrogen、A11011）

5. 脳組織を用いた定量 PCR

摘出した大脳皮質の後半 1/3 を切り出し計量した。脳組織 100 mg に対し Isogen II 1 mL を加え、ホモジナイズした後、微量高速冷却遠心機（4°C、12,000 \times g、15 分間）で遠心し、上清（組織溶解液）を回収した。組織溶解液 300 μ L に、それぞれ 0.4 倍量の MilliQ water を添加し、15 秒間ボルテックスをして室温で 10 分間静置した。その後、微量高速冷却遠心機（室温、15,000 \times g、15 分間）で遠心し、上清 150 μ L を回収した。そこに回収した上清と等量の 70% ethanol を加え、転倒混和し、10 分間室温で静置した後に微量高速冷却遠心機（4°C、15,000 \times g、10 分間）で遠心した。その後、上清を取り除き、70% ethanol を 500 μ L 加え、転倒混和し、微量高速冷却遠心機（4°C、15,000 \times g、3 分間）で遠心した。これをもう一度行い、上清を取り除いた後、室温で 1 時間程度風乾した。沈殿を MilliQ 水で溶解し、NanoDrop で RNA の濃度を測定し、500 ng の RNA を PrimeScript™ RT reagent kit を用いて 37°C で 30 分間逆転写酵素反応を行った。反応後、85°C で 5 秒間処理し、酵素を失活させた。サンプル化された cDNA 原液を 10 倍に希釈したものを、テンプレートとした。96-well plate の各 well に、KAPA SYBR 6.25 μ L、10 μ M に調整した forward と reverse primer をそれぞれ 0.5 μ L、MilliQ 水 3.25 μ L の計 10.5 μ L を加え、そこにテンプレートを 2 μ L ずつ加え、real-time qPCR を行った。

(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) メチル水銀によるマウスの記憶障害への脳内炎症応答の関与

我々はこれまでに、30 ppmの塩化メチル水銀（メチル水銀として約24 ppm）を含む飲水を自由に8週間摂取したマウスにおいて、短期および長期の記憶障害が惹起することを見出している。そこでまず、塩化メチル水銀（30 ppm）を2、4、6週間摂取したマウスの記憶能をY-maze test（短期記憶）およびNOR test（長期記憶）により経時的に再評価した。その結果、マウスの交代行動率および新規物体認識能はいずれもメチル水銀曝露6週目に低下し、当該記憶障害が生じるまでに少なくとも6週間程度の摂取が必要であることが判明した。なお、本曝露条件下においてマウスの体重はメチル水銀曝露の影響を受けることなく、対照群と比較しても同程度の体重増加を示した。次に、NeuN抗体を用いて神経細胞を、またIba1抗体を用いてミクログリアをそれぞれ免疫組織染色により可視化した結果、曝露4週目に前頭葉においてミクログリアが増加し、頭頂葉においても曝露6週目にその増加が観察された。一方、神経細胞は曝露6週目に前頭葉において僅かに減少し、頭頂葉では減少傾向を示した。なお、記憶機能において重要な脳領域である海馬においては、神経細胞およびミクログリアともにメチル水銀の影響を受けることはなかった。これらのことは、メチル水銀に曝露したマウスの脳では最初にミクログリアが活性化し、この応答が神経細胞の損傷に関与していることを示唆している。さらに、マウスの頭頂葉から採取したRNAを用いて、炎症性サイトカイン（IL-1 β 、OSM、TNF- α ）の発現を定量PCR法により解析した。しかし、いずれの曝露条件においてもメチル水銀による炎症性サイトカインの発現誘導は認められなかった。以上のことから、メチル水銀はマウスの前頭葉や頭頂葉において、炎症性サイトカインの発現を誘導することなくミクログリアの活性化を介して記憶障害を惹起していることが示唆された。

(2) メチル水銀による記憶障害へのミクログリアの関与

上記(1)の検討により、メチル水銀がマウスの脳内に入ると最初にミクログリアが活性化し、この応答に起因した神経細胞の損傷および記憶障害が惹起すると考えられる。昨年度は予備実験として、ミクログリア除去剤であるPLX3397（CSF1受容体阻害剤）を粉末餌に混ぜてメチル水銀と同時にマウスに摂取させることで記憶障害へのミクログリアの関与を検討した。しかし、本実験条件下ではミクログリアの除去率が約40%と低く、またミクログリアの他にマクロファージにも影響を与えるなどの問題が発生した。その中、我々は最近、特定の遺伝子欠損マウス（LMAマウス；遺伝子名は未公開）においてミクログリアのリポポリサッカライド（LPS）に対する応答が野生型マウスに比べて著しく低下していることを偶然見出した。このLMAマウスの腹内にLPSを投与すると、脳では炎症性サイトカインの発現誘導能が野生型マウスに比べて著しく低いのに対し、肝臓や腎臓では同程度の発現誘導能を示した。LMAマウス由来の脳スライスや初代ミクログリアにおいても、LPSに対する炎症性サイトカインの発現誘導能は低下していた。一方、初代マクロファージのLPSに対する発現誘導能は、LMAマウスで低下することなく野生型マウスと同程度であった。これらのことから、LMAマウスはマクロファージ活性に影響を与えることなくミクログリア活性のみが低下しているモデルマウスであることが示唆さ

れた。そこで次に、LMAマウスに30 ppmの塩化メチル水銀を含む飲水を8週間摂取させたところ、野生型マウスで認められたメチル水銀による短期および長期の記憶障害がほとんど認められなくなった。また、行動試験終了後に摘出した脳を免疫組織染色したところ、前頭葉や頭頂葉でのメチル水銀によるミクログリアの増加や錐体細胞の先端樹状突起の損傷がLMAマウスではほとんど観察されなかった。以上のことから、メチル水銀はミクログリアの活性化を介して錐体細胞の先端樹状突起に損傷を与えることで記憶障害を惹起することが示唆された。

IV 結論

メチル水銀は海馬に影響を与えることなく、前頭葉や頭頂葉においてミクログリアを活性化させることで錐体細胞の先端樹状突起に損傷を与え、この作用が短期および長期の記憶障害を惹起することが示唆された。海馬は特に短期記憶に関係があり、一時的に保管された記憶は大脳皮質に移動し長期記憶として保管される。また、新規な事象と既知の事象では学習と記憶に関する作業領域が異なり、新規事象は主に海馬傍回と嗅内皮質で、また長期記憶から想起した過去の事象は前頭葉と頭頂葉で処理されていることがこれまでの動物実験から示唆されている。以上のことから、メチル水銀は海馬以外の周囲、または大脳皮質の広範囲においてミクログリアを活性化させることで短期および長期の記憶を障害していることが示唆された。

V 次年度以降の計画

上述のように、メチル水銀は海馬に影響を与えることなく、前頭葉および頭頂葉にある錐体細胞の先端樹状突起に損傷を与えることで記憶障害を惹起することが示唆された。しかし、後頭葉および側頭葉もメチル水銀の影響を受けやすい領域としてよく知られており、これらの領域は記憶機能においても重要な役割を果たす。そこで、摘出したマウスの全脳を概ね10領域に分けてメチル水銀の蓄積量をはじめ、神経細胞やミクログリア、アストロサイト等の変動を免疫組織染色により詳細に検討することでメチル水銀による脳内損傷部位を特定する。また、ミクログリアは樹状突起上のスパインに沿って存在しシナプス前部と後部の両者に接触しており、不要なシナプスやスパインの除去等に関わっている。そこで、これらの作用に関わる因子へのメチル水銀の影響を検討するとともに、上記のLMAマウスやミクログリア細胞株（BV-2細胞）を併用することでメチル水銀によるミクログリアの活性化を介した錐体細胞の先端樹状突起の損傷に関わる分子機構を詳細に検討する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Toyama T Xu S Hasegawa T Kanemitsu Y Noguchi T Lee JY Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Methylmercury directly modifies the 105th cysteine residue in oncostatin M to promote binding to tumor necrosis factor receptor 3 and inhibit cell growth. Arch Toxicol 2023; 97:1887-1897.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. *Environ Health Prev* 2020; 25:30.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.

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

We previously found that methylmercury induces microglial expression of proinflammatory cytokines in the mouse brain and that pretreatment with liposomal clodronate, a microglial inhibitor, inhibits the neuronal cell death caused by methylmercury in mouse brain slices. We also found that short- and long-term memory were impaired in mice exposed to methylmercury-containing water (approximately 24 ppm methylmercury) for 8 weeks. In this study, we investigated the involvement of inflammatory cytokines and microglia in methylmercury-induced memory impairment based on mouse behavior and immunohistochemistry analyses. First, the mice were exposed to methylmercury-containing water in a time-dependent manner (2, 4, and 6 weeks), and short- and long-term memory loss was observed at 6 weeks. Immunostaining revealed increased microglia in the frontal lobe at 4 weeks and in the parietal lobe at 6 weeks. In contrast, neurons showed a slight decrease in the frontal lobe and a decreasing trend in the parietal lobe at 6 weeks after initiating exposure. Hippocampal neurons and microglia were unaffected by methylmercury exposure. Interestingly, the induction of inflammatory cytokine expression was not observed under these conditions. These results suggest that methylmercury induces memory impairment in the frontal and parietal lobes via microglial activation, without inducing inflammatory cytokine expression. We recently found that in X-deficient mice (gene name undisclosed; LMA mice), macrophage activity was not altered but only microglial activity was markedly reduced. When LMA mice were exposed to methylmercury for 8 weeks, increase in microglia and damage to the apical dendrites of pyramidal cells in the frontal and parietal lobes were suppressed; memory impairment was also significantly decreased. These findings suggest that methylmercury induces memory impairment by damaging pyramidal cells through microglial activation.