

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、従前よりメチル水銀(MeHg)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、その病態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、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病態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

昨年度までの本助成事業の支援により得た研究成果により、1)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、2)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⁾、3) DRG へのマクロファージの集積が見られること²⁾、4)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)、③回復期における神経新生の実態と④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 2 年目であるため、上記計画の中で①-③について遂行した。

II 材料と方法

1. MeHg、ミノサイクリン、および BrdU 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 MeHgCl 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、MeHgCl 水溶液投与 1 時間前に 30 mg/kg/day で腹腔内投与を行った。BrdU 投与は上述のスケジュールにおいて、MeHgCl 水溶液投与と同時に、100 mg/kg/day で腹腔内投与を行なった。

2. 脳および DRG の組織標本作成と組織学的解析

MeHg 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)、感覚神経線維、運動神経線維を摘出し、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 または視認による計数を行い、定量評価した。

3. DNA マイクロアレイによる神経細胞種特異的遺伝子発現解析

MeHg 投与したラットを投与開始 14 日後に二酸化炭素で深麻酔し、DRG を腰椎 L4-L5 より摘出した。摘出した DRG を Isogen-II により可溶化し、total mRNA サンプルとし、これを DNA マイクロアレイ解析に供した。発現量変動がコントロールより有意に 2 倍以上変動した遺伝子を対象に、統計学的解析を行なった。

(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薬科大学(承認番号P23-10)および電力中央研究所(承認番号2203-1)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。MeHg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. 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

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 日後の DRG を解析したところ、Iba1 陽性マクロファージ総数および CD68 陽性の貪食性マクロファージ数はミノサイクリン非投与群と比較して有意な差がなかった。また、神経細胞数の減少も大きな差が見られなかった。これは今回投与したミノサイクリン濃度が不足していた可能性が考えられるため、投与量を 100 mg/kg/day にしたサンプルを作成し、現在解析中である。

2. MeHg 曝露による神経細胞種特異的細胞死の組織学的経時的定量評価

MeHg 投与開始 7, 14, 28, 42, 56, 70 後とコントロールの DRG 切片を、機械受容神経細胞群(NF 群・NEFH 抗体)、痛覚受容神経細胞群 (NP3 群・SST 抗体)、痛覚受容神経細胞群 (PEP2 群・TrkA 抗体、FAM19A1 抗体) でそれぞれ弁別染色⁴⁾し、定量評価したところ、いずれの細胞群においても投与開始 14, 28 日後を中心に細胞数の減少が見られ、その後経時的にその数が増加した。また、総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(再評価)したところ、NeuN 陽性細胞数の経時変化は上記細胞群の変化と似たような傾向が観察されたが、いずれの時点においても統計学的に有意な差は得られなかった。

3. 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。一方で、細胞周期の全活動期 (G1, S, G2, M) のマーカーである Ki67 とニューロンマーカーで共染色したところ、MeHg 投与群のサンプルの一部において、Ki67 陽性ニューロンが観察された。

IV考察

これまで MeHg 曝露により、DRG において持続的にマクロファージの増殖が観察され、また CD68 陽性の貪食性マクロファージの一過性増加が観察されていた。この増殖マクロファージが DRG における神経細胞死にどのように影響しているかを明らかにするために、マクロファージ活性化抑制剤であるミノサイクリンを投与し、マクロファージの活性化を抑制した際の DRG 神経細胞病理解析を行なったが、マクロファージの増加や神経細胞死を抑制することができなかった。ミノサイクリンの投与量は既報の投与量 (30 mg/kg/day) で行ったものの、Iba1 陽性細胞数および CD68 陽性細胞数の増加を抑制できなかったのは、我々の実験条件における誘導マクロファージ増加に対してミノサイクリンの投与量が少なかった可能性が考えられた。そこで現在投与量を 100 mg/kg/day に増加させたサンプルを作成し、解析を進めている。

これまでの研究結果で得られていた痛覚特異的鈍麻とその回復の組織学的背景が末梢神経系にある可能性を考え、神経細胞の種類を免疫組織化学的に弁別し、痛覚担当細胞特異的な神経細胞死が見出せるかについて経時的細胞数定量解析を行なったところ、痛覚担当細胞である NP3 群および PEP2 群の双方において一過性の細胞数の減少とその後の経時的な細胞数の増加が観察された。一方で機械受容を担当している神経細胞群である NF 群についても同様の検討を行なったところ、NP3 群、PEP2 群と同様に一過性の細胞数減少とその後の増加が観察され、その時系列変化に大きな違いは見出せなかった。これはつまり、痛覚特異的鈍麻と回復の原因は末梢神経系ではない可能性を強く示唆するものと考えられる。

一方、MeHg 投与群において、一過性の神経細胞数の減少が見られた後、その細胞数が経時的に増加する現象は、成体神経新生である可能性がある。そこで細胞分裂した細胞をラベルすることができる BrdU を投与したラットに MeHg を投与し、BrdU と神経細胞マーカーの共染色を行なってみたが、BrdU と共染色される神経細胞は見出すことができなかった。これは BrdU 投与後サンプル採取するまでの期間が短かったことが原因と考えられ、細胞が分裂後神経細胞に分化するための十分な期間を取らなかった実験計画上の問題であると考えられた。一方で、分裂中の細胞マーカーである Ki67 と神経細胞マーカーの共染色を行なったところ、MeHg 投与ラット DRG において少数ではあるものの共染色される神経細胞が見出された。この現象はこれまでにその原因を考察しきれていないが、通常神経細胞に分化した細胞は分裂することがないため、MeHg という強力な毒物が作用したことにより引き起こされた現象である可能性を考えている。

V 結論

本年は本研究 2 年目であり、前年度までの結果を踏まえて痛覚特異的鈍麻の末梢神経系における組織学的病因探索を行なったが、痛覚担当細胞特異的な細胞死といった現象は観察できなかつたことから、本実験条件における痛覚特異的鈍麻は中枢性に原因がある可能性が示唆された。DRG の神経細胞数が投与一定期間後に経時的に増加する現象について、成体神経新生を考慮して実験を行ったものの、現時点で同現象が成体神経新生であるという明確な証拠は得られていない。

VI 今後の課題

マクロファージ活性化抑制による神経細胞死への影響については新たなミノサイクリン投与ラット DRG サンプルの解析結果が待たれるが、並行して別の方法（別の阻害剤やマクロファージ抑制性の動物の利用など）による解析も行う必要が考えられる。痛覚特異的鈍麻についてはその原因を末梢神経系に求められない可能性が出てきたため、懸案であった中枢神経系の解析も（本課題の末梢感覚神経障害とは少し外れるものの）進めていく必要がある。神経新生については BrdU を投与した MeHg 曝露ラットを新たなサンプリングポイントでの作成を進めている。また、神経新生の細胞系譜を明らかにするためのアデノ随伴ウイルスの作成が完了し、現在これを DRG に直接感染させる実験を遂行中である。

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) 46(9), 1162-1168. Potential association between methylmercury neurotoxicity and inflammation.
- 2) Eiko Yoshida, Kazuhiro Aoki, Yu Sasaki, Hinako Izuhara, Tsutomu Takahashi, Yasuyuki Fujiwara, Tomoya Fujie, Ke Du, Komyo Eto, Yo Shinoda* and Toshiyuki Kaji* (2024) *in press*. Comparative study of susceptibility to methylmercury cytotoxicity in cell types composing rat peripheral nerves: a higher susceptibility of dorsal root ganglion neurons.

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)

The focus of research on Minamata disease, identified as Hunter-Russell syndrome, primarily centers on its manifestation as a central nervous system disorder. Despite extensive investigations into the mechanism of methylmercury toxicity primarily within the central nervous system, there exists a notable gap in the exploration of peripheral neuropathy, particularly in cases marked by a prevalence of sensory nerve injuries observed in the early stages of Minamata disease.

This study seeks to delve into the intricacies of "methylmercury-induced peripheral sensory nerve damage, selective impairment of pain perception, and its recovery." The findings stem from a comprehensive six-year research project on Minamata disease led by Principal Investigator Toshiyuki Kaji, Research Collaborator Yo Shinoda, and Research Participant Eiko Yoshida, spanning until the previous fiscal year.

The research is structured into three key areas of investigation:

1. Examination of the dorsal root ganglion (DRG) in MeHg-treated rats reveals an accumulation of macrophages. This prompts the critical question of whether this accumulation is a consequence of neuronal cell death within the DRG or if it serves as a factor inducing or exacerbating neuronal cell death in the same region.
2. Stimulus response analysis of MeHg-treated rats highlights a distinctive impairment in pain perception, compared to touch, cold, and warmth modalities. The study aims to elucidate the mechanism behind this selective impairment of pain.
3. Investigation into the source and mechanism of neurogenesis leading to this recovery, seeking to identify the cells and processes responsible for the observed regeneration.

By addressing these three key points, our research aims to establish a comprehensive understanding of the cellular and molecular biological basis underlying MeHg-induced peripheral sensory neuropathy and its subsequent recovery.