

# メチル水銀による小胞体ストレス介在性神経細胞死検出部位の同定と特異的阻害薬の神経症状抑制効果

主任研究者 上原 孝

岡山大学・学術研究院医歯薬学域・薬効解析学 教授

## 研究要旨

これまでに、メチル水銀 (MeHg) 曝露がマウス脳においてニューロン特異的な小胞体 (ER) ストレスを誘導することを報告してきた。過剰な ER ストレスはアポトーシス惹起に寄与し、CHOP 誘導がその主要なメカニズムの一つと推定されている。昨年までに解析結果から、CHOP 発現レベルはマウスの脳でも MeHg 曝露によって増加し、アポトーシスの増加と相関していることが明らかとなった。そこで、本研究では、CHOP が MeHg 誘発アポトーシスを媒介するかどうかを明らかにするため、CHOP ノックアウトマウスを用いて MeHg 曝露に対する神経細胞死への影響を調べた。その結果、CHOP 欠失マウスは MeHg 曝露による体重減少や後肢障害に影響を与えず、アポトーシスの増加や神経細胞の減少の抑制も認められなかった。したがって、CHOP は MeHg 毒性にはほとんど関与しておらず、MeHg による細胞死には ER ストレスと連関した他の unfolded protein response (UPR) 経路が関与している可能性が示唆された。

## I 研究目的

これまでにメチル水銀誘発性神経細胞死発症メカニズムに関して多くの知見が提示されてきた。水俣病の治療に関しては、未だに明確な方針やシード化合物・候補薬が決定されているとは言い難い。申請者は、マウスへのメチル水銀投与によって観察される大脳皮質や線条体の神経細胞死は、小胞体ストレスを介して惹起されることを証明してきた<sup>1-4</sup>。初期的な実験から、この細胞死や神経症状はタンパク質凝集阻害効果を有するケミカルシャペロンによって著明に回復することを明らかにした。以上の成果は、ケミカルシャペロンが水俣病治療に有効である可能性を示唆するものである。一方、この薬物はメチル水銀曝露前に投与しており、「治療」という側面からは、真に薬理効果を発揮するとは言い切れない。そこで、治療薬としての可能性を明らかにするため、4-PBA の therapeutic time-window を追求する。また、メチル水銀毒性の小胞体ストレス応答の関与をさらに証明するために、小胞体ストレス応答シグナルの下流に位置し、細胞死実行に関わる CHOP のノックアウトマウスを用いて、メチル水銀による神経細胞死が減弱するか否かを検討する。

## II 材料と方法

### 1. 材料

CHOP KO マウスは親泊政一教授（徳島大学ゲノム研究所）よりご恵与頂いた<sup>5, 6</sup>。本マウスは C57BL/6 を遺伝的バックグラウンドとしている。本マウスは国立水俣病総合研究センター動物実験施設において飼育した。飼育条件は、コンベンショナル条件下、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、明暗周期 12 時間（午前 6 時～午後 6 時まで照明下）である。飼育および実験期間中の食餌や飲水は自由に行わせた。本マウスを用いた動物実験は国立水俣病総合研究センター動物実験委員会より承認を得ており（承認番号：050315-1）、当センターの規定に基づき実施した。

### 2. ジェノタイプピング

雄性 CHOP KO マウスと雌性 CHOP KO マウスを交配させ、妊娠・出産させた。得られた雄性マウス（3 週齢）の尾の先端を 1 mm 程切断し、採取した。採取した尾組織から DNA を抽出し、PCR 法により CHOP が欠失していることを確認した。

### 3. 薬物投与

#### 1) メチル水銀飲水投与

塩化メチル水銀と等モル量の還元型 GSH を milli Q 水に溶解させ、終濃度 30 あるいは 50 ppm のメチル水銀含有飲水を調製した。これを給水ボトルに入れ、雄性 CHOP KO マウスに自由摂取させた。コントロール群には、メチル水銀投与群と等量の還元型 GSH を milli Q 水に溶解させたものを投与した。

#### 2) 4-Phenylbutyric acid (4-PBA) の腹腔内投与

4-PBA（東京化成，P0643）120 mg を生理食塩水 10 mL に添加し、4-PBA と同モル量の水酸化ナトリウムを加え溶解させた（pH 7.4）。雄性 CHOP KO マウスに終濃度 120 mg/kg/day となるように腹腔内投与を行った。コントロール群には生理食塩水を投与した。

### 4. 後肢伸長反応の観察

メチル水銀を飲水投与したマウスを飼育ケージから取り出し、マウスの尾を持ち上げ 10 秒間吊るした。週に 1 度、マウスを吊るした際の後肢の伸展状態を観察し、その所見から以下に示すスコアを定義することでメチル水銀曝露による神経障害を評価した。

### 後肢伸長反応の所見スコア

Score	後肢の状態
3	後肢が自由に動いている（異常は見られない）
2	後肢が自由に動いているが、その頻度が減少する
1	後肢の運動がほとんど見られない
0	後肢が完全に交差する（後肢交叉）

両後肢が体側から大きく外側に広がる場合を0点（正常な表現型），片方の後肢が腹部側に後退している，あるいは両後肢が後退しているが体側よりも外側に位置する場合を-1点（軽度の障害），接触はしないが両後肢が体側よりも内側に位置する場合を-2点（中等度の障害），両後肢が腹部側に完全に後退し，互いに接触している場合を-3点（重度の障害）として，-3点から0点までの4段階で各個体の後肢伸展反射の障害を評価した（下図）。

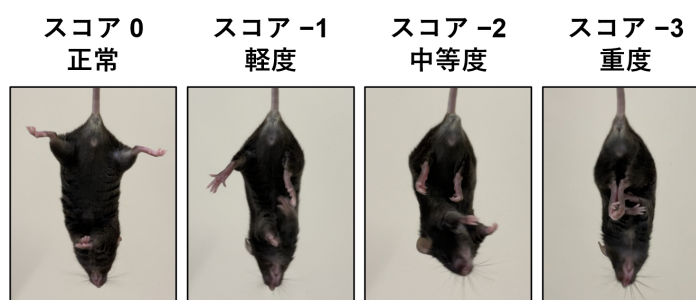


図. 後肢伸展反射の評価

### 5. 組織中総水銀量の測定

メチル水銀を飲水投与したマウスをイソフルラン麻酔下で開胸し，心採血により屠殺した．生理食塩水で十分に灌流した後，脳を摘出した．脳組織に関しては大脳皮質，小脳，海馬，線条体に部位分けを行った．各組織に対して組織重量の19倍量となる5N水酸化ナトリウム（NaOH）を添加し，70℃に設定したアルミブロック恒温槽で30分間静置した．溶解した組織を5N塩酸（HCl）で中和し，MA-2000（日本インスツルメンツ）を用いた加熱気化法により総水銀量を測定した．この時，既知濃度の水銀含有溶液から得られた測定値を基に検量線を作成し，未知試料の水銀量を算出した．

### 6. 免疫組織染色

## 1) パラフィン包埋脳切片の作製

メチル水銀を飲水投与したマウスを解剖し、脳を摘出した。摘出後、剃刀を用いて脳を右脳と左脳に分け、左脳を4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液に浸し固定化を行った。その後、パラフィン包埋脳組織サンプルに関しては、株式会社バイオ病理研究所に作製を依頼した。回転式マイクロトーム (Leica) を用い、パラフィン包埋脳組織から5  $\mu\text{m}$  のサジタル脳切片を作製した。

## 2) 組織染色

切片は各種染色に供する前に、以下の前処理を行った。キシレン中で5分間 $\times$ 3回静置し、パラフィンを除去した。エタノール中で5分間静置し、キシレンを除去した。続いて滅菌精製水で90%, 80%, 70%に調製したエタノール中で順に各5分間静置した。10分間の流水洗によってエタノールを除去した後、滅菌精製水で切片を洗浄した。

前処理した切片を10 mM Citrate buffer pH 6に浸し、600Wに設定した電子レンジで20分間加熱することで、抗原賦活化処理を行った。室温で30分以上冷ました後、滅菌精製水で切片を洗浄した。切片をメタノールで調製した3 v/v% 過酸化水素中で20分間静置することで、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。PBS中で5分間 $\times$ 2回洗浄した後、切片をブロッキング処理および抗原抗体反応に供した。ブロッキング処理および抗原抗体反応はVECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories) を用いて行った。発色はDAB Substrate Kit (Vector Laboratories) を用いて行った。水気を切った切片にBlocking solution 250  $\mu\text{L}$  を添加し、室温で20分間静置した。PBS中で10分間 $\times$ 2回洗浄した後、Primary antibody solution 250  $\mu\text{L}$  を切片に添加し、室温で30分間静置した。PBS中で10分間 $\times$ 2回洗浄した後、Secondary antibody solution 250  $\mu\text{L}$  を切片に添加し、室温で30分間静置した。PBS中で10分間 $\times$ 2回洗浄した後、ABC reagent 250  $\mu\text{L}$  を切片に添加し、室温で30分間静置した。PBS中で10分間 $\times$ 2回洗浄した後、Substrate working solution 250  $\mu\text{L}$  を切片に添加し、室温で2分間静置した。直後に、水を満たしたドーズで切片を濯ぐことで発色反応を停止した。5分間の流水洗によって基質を除去し、滅菌精製水で切片を洗浄した。切片をエタノール中で5分間 $\times$ 3回静置し、脱水処理を行った後、キシレン中で5分間 $\times$ 3回静置し、透徹処理を行った。免疫組織化学染色用封入剤EUKIT(ORSAtec)を切片に適量添加し、カバーガラスを重ねて封入した。染色像は、アレン脳科学研究所がオンラインで公開している成体マウスの脳地図 (<http://atlas.brain-map.org/>) を参照し、偏光顕微鏡BX5 (Evident) を用いて撮影した。ImageJ version 1.54dを用いて定量解析を行った。

## 8. TUNEL 染色

TUNEL 染色は In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) を用いて行った。Proteinase K を 10 mM Tris-HCl pH 7.5 で 1,000 倍に希釈し、終濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Proteinase K を含む浸透化液を調製した。前項の通りに前処理した切片に浸透化液 300  $\mu\text{L}$  を添加し、切片を並べた湿式チャンバーを 37°C に設定した恒温槽中で 20 分間静置した。切片を Phosphate-buffered saline 中で 5 分間×2 回洗浄し、水気を切ったあとに TUNEL 反応液 20  $\mu\text{L}$  を添加した。プラスチックフィルムで切片を覆い、切片を並べた湿式チャンバーを 37°C に設定した恒温槽中で 1 時間静置した。PBS 中で 5 分間×3 回洗浄した後、水気を切った切片に 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含有した蛍光染色用封入剤 VECTASHILD Vibrance Antifade Mounting with DAPI (Vector Laboratories) 40  $\mu\text{L}$  を添加し、カバーガラスを重ねて封入した。染色像は、アレン脳科学研究所がオンラインで公開している成体マウスの脳地図 (<http://atlas.brain-map.org/>) を参照し、共焦点顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon Instruments) を用いて撮影した。NIS-Elements AR imaging software version 4.00.06 (Nikon Instruments) を用いて定量解析を行った。

## 9. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表した。統計解析およびグラフの作成には GraphPad Prism software version 10.0.2 (GraphPad Software) を使用した。群間の平均値の差は Two-way analysis of variance (ANOVA) により検定し、事後検定として Uncorrected Fisher's LSD または Tukey's multiple comparisons test を実施した。上記の検定の結果、 $p < 0.05$  の場合に統計学的に有意であるとみなした ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ; ns, not significant)。

### (倫理面への配慮)

国立水俣病総合研究センターにおいては、動物倫理・運営委員会（承認時期：令和4年3月7日、令和5年3月23日、令和5年4月27日）で承認を受けた。

### Ⅲ 研究結果

#### 1. マウスへの MeHg の曝露

30 ppm の MeHg を含む飲水を 8 週間投与した雄性 C57BL/6NJc1 マウスの大脳皮質において、神経細胞の減少やアポトーシス細胞の増加などの神経病理学的変化が認められる。そこで、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスに先行研究と同様の手法で MeHg を曝露させ、両マウスの病態および中毒症状の経過を比較することで、MeHg 毒性に対する CHOP 欠失の影響を検討した (図 1)。



図 1. MeHg の亜慢性曝露

野生型マウス(WT)および CHOP ノックアウトマウス(KO)に Vehicle または 30ppm の MeHg を含む飲水を 8 週間自由に摂取させた。その後、マウスを解剖し以降の解析に供した(WT + Vehicle,  $n = 6$ ; WT + MeHg,  $n = 9$ ; KO + Vehicle,  $n = 6$ ; KO + MeHg,  $n = 11$ )。

#### 2. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響

MeHg の蓄積に対する CHOP 欠失の影響を検証した。図 1 で示した通りに Vehicle または MeHg を曝露させた野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスから血液および大脳を採取し、試料中の総水銀含量を測定した。その結果、野生型マウスでは MeHg の曝露によって血液および大脳で水銀量の有意な増加が認められ (図 2) , 血中水銀含量は先行研究 ( $14.0 \pm 1.6$  ppm) と同程度であった。一方、CHOP ノックアウトマウスの血液および大脳においても、MeHg の曝露によって野生型マウスと同程度の水銀が蓄積しており、両者に差異は認められなかった (図 2) 。以上の結果から、CHOP の欠失は少なくとも投与 8 週目における、MeHg の血液および大脳の存在量にはほとんど影響しないことが示唆された。

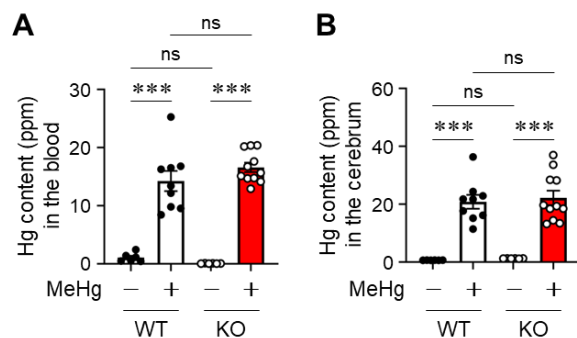


図 2. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響

A: 血液中総水銀量, B: 大脳中総水銀量

#### 3. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響

動物実験における MeHg 中毒の神経症候学的指標として、体重減少、運動失調、歩行障害、後肢伸展反射の障害、正向反射消失、自発運動量増加、学習障害、痙攣、麻痺などが報告されている。本項では、げっ歯類における MeHg 毒性評価の代表的な指標である後肢伸展反射の障害と体重減少に着目し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した。正常なマウスは尾を持ち上げて逆さに吊ると、両後肢の伸展反射が認められる。一方で、MeHg 中毒が進行すると、次第に両後肢が近接することが知られている。Vehicle を投与した野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間では、解析期間を通じてスコアに差異は認められなかったことから（図 3A）、CHOP の欠失は正常な後肢伸展反射に影響しないことがわかった。MeHg に曝露された野生型マウスでは、投与 5 週目から次第にスコアが低下し 6 週目から 8 週目にかけて有意であった（図中には未記載）。一方で、MeHg に曝露された野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間では、解析期間を通じてスコアの推移に有意な差は認められなかった（図 3A）。また、MeHg に曝露されたマウスでは、後肢伸展反射の障害から後行して体重の低下も観察されるが、体重に関しても同様に、解析期間を通じて野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間で差異は認められなかった（図 3B）。

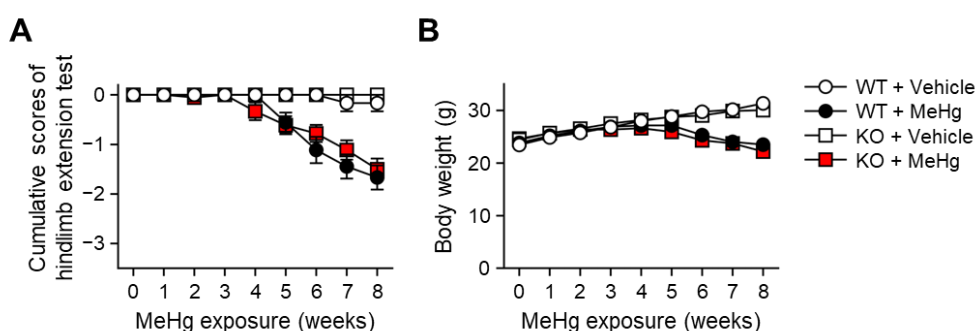


図 3. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響  
A: 後肢伸展反射スコアの推移, B: 体重の推移

#### 4. MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響

我々は以前に、MeHg に曝露されたマウス的大脑皮質および線条体において、アポトーシスの増加に伴って CHOP の発現が誘導されることを観察している。そこで、TUNEL 染色によって大脑皮質および線条体の細胞死を解析し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した。先行研究の結果と一致して、野生型マウス的大脑皮質運動野および線条体では、MeHg の曝露によって TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。一方で、CHOP ノックアウトマウスにおいても MeHg の

曝露によって、野生型マウスと同程度に大脳皮質運動野および線条体で TUNEL 陽性細胞が増加しており、両者に差異は認められなかった(図 4A, B). 続いて、神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色によって大脳皮質運動野および線条体の神経細胞数を解析し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した. その結果、MeHg の曝露によって野生型マウスの大脳皮質運動野および線条体において神経細胞が有意に減少したが、CHOP ノックアウトマウスとの間に差異は認められなかった(図 4C, D). すなわち、MeHg 誘発性神経細胞死に対して CHOP 欠失による保護的な効果は認められなかった.

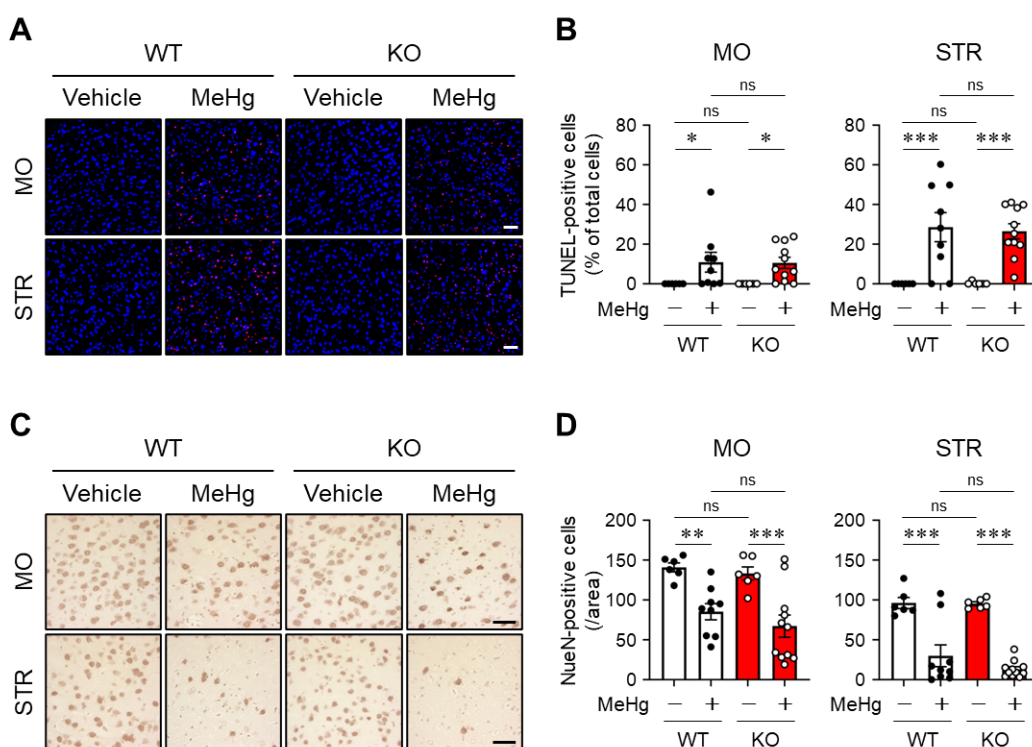


図 4. MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響

A: TUNEL 染色像, B: TUNEL 陽性細胞の定量図,

C: NeuN 免疫組織染色像, D: NeuN 陽性細胞の定量図

#### IV 考察

我々はこれまで、PERK 阻害薬である GSK2606414 や化学シャペロンである 4-フェニル酪酸が MeHg による細胞死を抑制することを観察しており、ER ストレスおよび UPR の活性化が MeHg 誘導性アポトーシスの有力な要因の一つであると推定している. 一般に、CHOP の誘導は ER ストレスに起因したアポトーシスの代表



的な経路と考えられており、CHOP ノックアウトマウスは脳虚血や 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) によって誘発される神経細胞死に抵抗性を示す。一方で、本研究から CHOP の欠失のみでは MeHg 誘発性神経細胞死に決定的な影響を与えないことが判明した。UPR の活性化は最終的に多様な転写因子を駆動し、遺伝子発現調節を介して細胞恒常性の回復に働く。しかしながら、過度の ER ストレスに起因したアポトーシスの誘導に関しては、個々の転写因子がどのように機能しているのかは不明な点が多い。興味深いことに、MeHg は CHOP の他にも、IRE1 $\alpha$  下流の Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (c-JUN) および X-box binding protein 1 (XBP1), PERK 下流の activating transcription factor 4 (ATF4), そして ATF6 の細胞質ドメイン (ATF6f) などの転写因子の誘導や活性化を引き起こすことが示唆されている。本研究成果に基づくと、ER ストレスに関連した CHOP 非介在性のストレス応答機構が、MeHg 誘導性アポトーシスに寄与する可能性が考えられる (図 5) <sup>7</sup>。

以上の成果は、MeHg 中毒においては脳虚血モデルや 6-OHDA 誘発性パーキンソン病モデルとは異なるメカニズムで、神経細胞のアポトーシスが進行することを示唆しており、MeHg 誘導性 ER ストレスによる神経細胞死の機序解明にとって重要な知見を与えるものである。

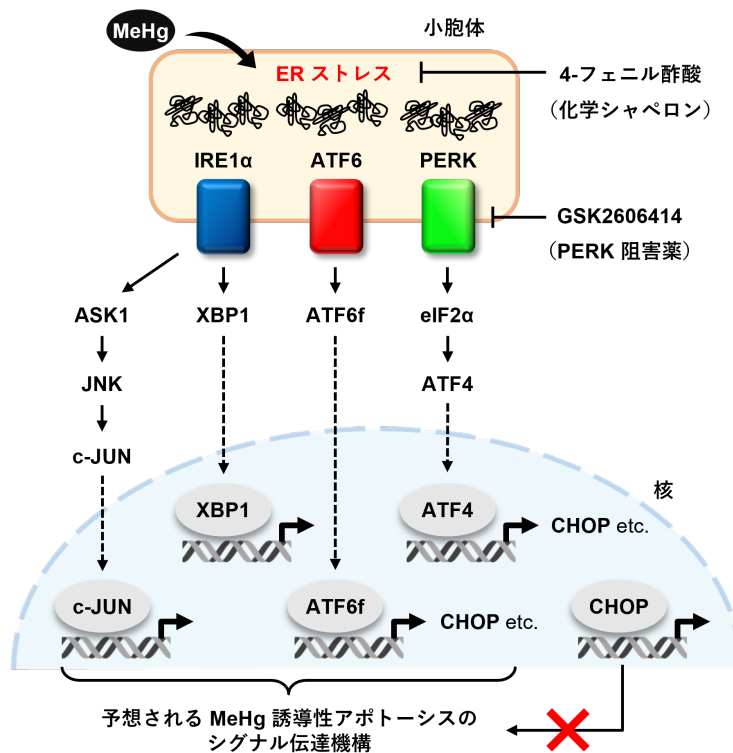


図 5. MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構の展望

## V 結論

1. MeHg による後肢伸展反射の障害および体重減少に対して、CHOP 欠失はほとんど影響しない。
2. MeHg による神経細胞死に対して、CHOP 欠失はほとんど影響しない。

## VI 今後の課題

1. MeHg による神経細胞死に関しては、大脳皮質および線条体において観察され、これは小胞体ストレス (unfolded protein response) 発生との関連性を証明している。しかしながら、他の部位に関しては、詳細な解析を行っていない。この点を追求することが必要である。
2. 小胞体ストレスを軽減するケミカルシャペロン (4-PBA) の効果に関しては、MeHg との同時投与による効果しか検討していない。そこで、therapeutic time window を明らかにするために、MeHg 投与どのくらいの後処理でも神経細胞死抑制効果を発揮するのかを検討する必要がある。

## 本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Iijima, Y., Miki, R., Fujimura, M., Oyadomari, S., and **Uehara, T.\***. Methylmercury-induced brain neuronal death in CHOP-knockout mice. *J. Toxicol. Sci.* 2024; 49 (2):55-60. doi: 10.2131/jts.49.55.

## 引用文献

- 1) Makino, K., Okuda, K., Sugino, E., Nishiya, T., Toyama, T., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., and **Uehara, T.\***. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox. Res.* 2015; 27: 99-105. [IF:3.978](#)
- 2) Hiraoka, H., Nakahara, K., Kaneko, Y., Akiyama, S., Okuda, K., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., Takasugi, N., and **Uehara, T.\*** Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* 2017; 40: 1595-1598. [IF:2.264](#)
- 3) Hiraoka, H., Nomura, R., Takasugi, N., Akai, R., Iwawaki, T., Kumagai, Y., Fujimura, M., and **Uehara, T.\*** Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain. *Arch Toxicol.* 2021; 95(4):1241-1250. doi: 10.1007/s00204-021-02982-9. [IF: 6.168](#)

- 4) Nomura, R., Takasugi, N., Hiraoka, H., Iijima, Y., Iwawaki, T., Kumagai, Y., Fujimura, M., and **Uehara, T.\*** Alterations in UPR Signaling by Methylmercury Trigger Neuronal Cell Death in the Mouse Brain. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(23):15412. doi: 10.3390/ijms232315412. IF: 6.208
- 5) Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(19):10845-50.
- 6) Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. Targeted disruption of the CHOP gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002; 109(4):525-32.
- 7) Iijima, Y., Miki, R., Fujimura, M., Oyadomari, S., and **Uehara, T.\***. Methylmercury-induced brain neuronal death in CHOP-knockout mice. *J. Toxicol. Sci.* 2024; 49 (2):55-60. doi: 10.2131/jts.49.55.

#### 英文要約 (Abstract)

Apoptosis is a hallmark of MeHg-induced neuronal cell death; however, its molecular mechanism remains unclear. We previously reported that MeHg exposure induces neuron-specific ER stress in the mouse brain. Excessive ER stress contributes to apoptosis, and CHOP induction is considered to be a major mechanism. CHOP was also increased by MeHg treatment in the mouse brain, suggesting that it correlates with increased apoptosis. In this study, to clarify whether CHOP mediates MeHg-induced apoptosis, we examined the effect of CHOP deletion on MeHg exposure in CHOP-KO mice. Our data showed that CHOP deletion had no effect on MeHg exposure-induced weight loss or hindlimb impairment in mice, nor did it increase apoptosis or inhibit neuronal cell loss. Hence, CHOP plays a minor role in MeHg toxicity, and other apoptotic pathways coupled with ER stress may be involved in MeHg-induced cell death.