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 所属研究機関 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、塩化メチル水銀含有水(終濃度 30 ppm;メチル水銀として約 24 ppm) を曝露したマウスにおいて短期および長期の記憶障害が観察され、これらの障害にミクロ グリアの活性化が関与することを見出している。また、メチル水銀はミクログリアで炎症性 サイトカインを発現誘導することなく、未知の作用を介して神経細胞損傷を惹起すること が示唆されている。一方、本曝露条件下ではマウスの体重減少や自発運動量の低下などが全 く観察されなかった。そこで、今回は運動機能の軽微な低下も評価できる行動試験系を再構 築しメチル水銀の運動機能への影響とミクログリア活性化との関係を検討した。その結果、 ミクログリア活性の低いモデルマウス(LMA マウス)では、メチル水銀による運動機能障 害や神経細胞損傷がほとんど認められなかった。また、摘出した脳を12領域に分けて免疫 組織染色を行った結果、メチル水銀は前頭前皮質、頭頂葉、運動野の他に嗅球、線条体、視 床下部および視覚野においてもミクログリア活性化を介して神経細胞傷害を惹起している ことが示唆された。一方、メチル水銀による領域選択的な神経細胞傷害はメチル水銀蓄積量 に依存することなく、未知の機構が関与していることが示唆された。メチル水銀による神経 細胞傷害が観察された運動野では、細胞傷害性の M1 型ミクログリアが増加するとともに神 経細胞でのCX3CL1の発現は低下していた。神経細胞のCX3CL1はミクログリアのCX3CR1 と相互作用することでミクログリアの過剰な活性化を抑制しており、メチル水銀はCX3CL1 と CX3CR1 の相互作用を破綻させることでミクログリアを活性化し、これが神経細胞損傷 を惹起している可能性が示唆された。

キーワード:メチル水銀、ミクログリア

研究協力者

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、塩化メチル水銀含有水(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、またこれら の記憶障害と前頭葉および頭頂葉における神経細胞の減少が曝露 6 週目から認められるの に対し、ミクログリアは曝露 4 週目から増加することを見出している。さらに、ミクログリ ア活性の低いモデルマウス(LMA マウス)では、メチル水銀による神経細胞の損傷がほと んど観察されず記憶障害も大幅に改善されたことから、メチル水銀はミクログリア活性化 を介して神経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ている。一方、 上記の曝露条件ではマウスの体重減少や自発運動量の低下、飛び跳ねるといった異常行動、 見た目(毛並みなど)の違いが全く観察されなかったことから運動機能に関わる行動試験を 実施していなかった。そこで本研究では、メチル水銀の運動機能への軽微な影響を評価する 行動試験系を再構築するとともに、LMA マウスを用いて運動機能の評価および免疫組織化 学染色を実施した。また、メチル水銀によるマウスの脳内損傷部位の特定やミクログリア活 性化を介した神経細胞の損傷に関わる因子の同定を試みた。

Ⅱ 材料と方法

1. マウスの飼育とメチル水銀曝露

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±2℃、湿度 55±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 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) を含む蒸留水に溶解さ せた飲料水を同期間摂取させた。

2. Rotarod test (運動協調性の評価)

加速ロータロッド(model: Cat. No.47600、UGO Basile)を使用して実施した。Rotarod test は、2日間の訓練試行とテスト試行で構成される。訓練試行では、10 rpm で回転させたロッ ド上を 180 秒間歩行させた(1日2回の試行)。テスト試行では、定速回転条件(10 or 20 rpm)あるいは加速回転条件下(5 rpm で回転し始め、180秒後に 30 rpm まで加速)におい てマウスが回転ロッドから落下するまでの時間を合計2回測定し、落下時間は各試行の平 均値として算出した。各試行のカットオフ値は180秒とした。なお、訓練試行ならびにテス ト試行は試行間に少なくとも10分の休息時間を設けて実施した。 3. Beam walking test (平衡感覚の評価)

Beam walking test は、Thin らの方法に従って行った。ビーム装置は、幅 20× 奥行 1000× 高さ 10 mm の、平面角材(ビーム)を地上高さ 50 cm の二本の支柱に設置したものである。 ビーム装置の一端には、ケージ内の巣材を敷き詰めた黒い箱(セーフボックス)を置き、ゴ ール地点を設け、もう一端にあるスタート地点は、LED ランプ(12 W)により照らした。 LED ランプの嫌悪刺激によりマウスはゴール地点へ誘導される。マウスがスタート地点~ ゴール地点(80 cm)へ横断するまでの時間は、測定者により目視で測定した。なお、横断 時間はマウスの前肢がスタートラインを超えてからゴールラインに到達するまでの時間と 定義した。Beam walking test は2日間の訓練試行とテスト試行で構成され、1日目の訓練試 行では、幅 20 mm のビームを 1 回、幅 10 mm のビーム棒を 2 回横断させた。2 日目の訓練 試行では、幅 10 mm のビーム棒を 3 回横断させた。マウスは通常、停止することなくビー ムを横断するが、前に進まずに立ち止まったり、匂いを嗅いだりした場合は、測定者が手袋 をした指で横断を促した。また、マウスがセーフボックスに侵入したら、ボックス内で20 秒ほど休息させた(セーフゾーンの学習)。3 日目のテスト試行では幅 10 mm のビームを渡 りきるまでの時間を測定した。マウスがビーム上で止まらずに横断した 2 回の試行を平均 した(ただし、テスト試行の反復は測定結果に影響を与える可能性を考慮し、試行回数は5 回までとした)。なお、訓練試行およびテスト試行は、試行間に少なくとも10分の休息時間 を設けて実施した。

4. Pole test (動作緩徐の評価)

Pole test は、Ogawa らの方法を一部改変して行った。マウスを粗面化した木製の垂直ポー ル(直径 10 mm、高さ 50 cm)の最上部に上向きに捕まらせ、マウスが動き始めてから回転 して下に向くまでの時間(time to turn)ならびに下に降りるまでの時間(time to finish)を測 定した。Pole test は 2 日間の訓練試行とテスト試行で構成される。訓練試行では、測定者が 手袋をした状態でマウスの尾を持ち、ポール最上部から下部まで降りる動作を学習させた (1日 2回の試行)。テスト試行は 2回施行され、time to turn ならびに time to finish は 2回 の平均値として算出した。なお、訓練試行およびテスト試行は、試行間に少なくとも 10分 の休息時間を設けて実施した。

5. 脳組織を用いた免疫蛍光染色

行動試験を終えたマウスは三種混合麻酔薬(Medetomidine、Midazolam、Butorphanol)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%-パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(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℃の固定液に 浸して再固定を行った。ホルマリン固定した脳組織から、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。得られた脳切片は PBS で 15 分おきに 2 回 洗浄した後、10% NGS or NDS-in PBS で 1 時間ブロッキングした。その後、PBS で 15 分お きに 2 回洗浄し、1% NGS or NDS -in PBS で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 or NDS -in PBS で希釈した二次抗体と 4°C で一晩反応させた。PBS で 30 分おきに 4 回洗浄後、SlowFadeTM diamond antifade mountant を 滴下し、カバーグラスで封入した。免疫蛍光は C2 confocal microscope system (Nikon) を用 いて可視化させた。

6. 水銀蓄積量

固定した脳組織を Paxinos & Franklin's Mouse Brain in Stereotaxic を参考に、嗅球、前頭前 皮質、線条体、運動野、体性感覚野、視床下部、扁桃体、頭頂葉、海馬、視覚野、聴覚野、 小脳に部位分けした。部位分けした脳組織は、加熱気化水銀測定装置 MA-3 Solo(日本イン スツルメンツ)による加熱気化法によって組織重量あたりの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。

7. 統計処理

平均値(means) ± 標準誤差(SEM)で示した。群間の有意差検定には、2元配置分散分 析後に Turkey の多重比較検定を用いた。ただし、2 群間の比較には t 検定を用いた。また、 すべての検定法において危険率 5%未満を統計的に有意であるとみなした。なお、統計解析 には GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc)を用いた。

(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. メチル水銀による運動機能の軽微な低下を評価する行動試験系の構築

前述のように、30 ppm の塩化メチル水銀に 8 週間曝露したマウスでは、体重減少や自発 運動量の低下、飛び跳ねるといった異常行動、見た目(毛並みなど)の違いが観察されなか ったことから、運動機能の軽微な低下を評価する行動試験系の構築を試みた。まず、運動協 調性を評価する rotarod test は、定速の回転数 10 rpm ではメチル水銀曝露の影響が認められ なかった。次に野生型マウスの一部が計測時間(180 秒)内に落下するような定速回転条件 (20 rpm)、あるいは回転ロッドの回転が徐々に加速する条件(5 rpm で回転し始め、180 秒 後に 30 rpm となる)に設定することで野生型マウスに比べてメチル水銀曝露マウスにおい て回転ロッドからの落下時間(time to fall)が有意に短くなった。平衡感覚を評価する beam walking test は、幅 2 cm の棒では両群間の歩行速度に違いがなく、幅 1 cm の棒においてメ チル水銀曝露による歩行速度の減少が認められた。動作緩徐を評価する pole test も、直径 1 cm の垂直棒を用いることで動き始めてから回転して下に向くまでの時間(time to turn)な らびに下に降りるまでの時間(time to finish)がメチル水銀曝露マウスにおいて延長した。 以上のことから、上記の行動試験系を用いてメチル水銀による運動機能障害とミクログリ アとの関係を検討することにした。

2. メチル水銀による運動障害へのミクログリアの関与

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 ログリア活性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 マウスはマクロファージ活性が野生型マウスと同等であったことからミクログリア活性だ けが低いモデルマウスである。そこで次に、LMA マウスに 30 ppm の塩化メチル水銀を含む 水を 8 週間摂取させたところ、上記(1)の rotarod test、beam walking test および pole test で 観察されたメチル水銀による運動機能の低下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、メチル水銀曝露マウスの運動野におけ るミクログリアの増加や神経細胞の減少が 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活性化を介して神経細胞に損傷を与えることで 運動機能障害を惹起することが示唆された。

3. メチル水銀に曝露したマウスの脳内損傷領域

これまでの検討により、メチル水銀はマウス脳中の前頭葉や頭頂葉、運動野に損傷を与え ることで記憶障害や運動障害を惹起することが示唆されている。しかし、これらの領域以外 の運動機能や感覚情報の処理に関与する領域に与えるメチル水銀の影響は不明であり、各 脳領域間のメチル水銀蓄積量の比較検討も必要である。そこで、30 ppm の塩化メチル水銀 に 8 週間曝露したマウスから摘出した脳を 12 領域(嗅球、前頭前皮質、線条体、運動野、 体性感覚野、視床下部、扁桃体、頭頂葉、海馬、視覚野、聴覚野、小脳)に分けて、各領域 の神経細胞やミクログリアにメチル水銀が与える影響を免疫組織化学染色により検討した。 また、これらの領域中の水銀蓄積量を測定することで神経細胞損傷との関係も調べた。まず、 各領域中のミクログリアを免疫組織染色により調べた結果、海馬や視聴覚、小脳ではメチル 水銀によるミクログリアの増加が認められなかったのに対し、他の領域では有意な増加が 認められ、特に線条体および扁桃体では野生型マウスに比べて約 2 倍に増加していた。一 方、神経細胞はミクログリアの増加が認められた多くの領域において減少していたが、体性 感覚野や扁桃体、海馬、聴覚野、小脳ではその減少が認められなかった。以上のことから、 メチル水銀は前頭前皮質、頭頂葉、運動野の他に嗅球、線条体および視覚野においてもミク ログリア活性化を介して神経細胞傷害を惹起していることが示唆された。 次に、脳内水銀蓄積量を各領域間で比較したところ、多くの領域において平均 6 ppm 前後 であったのに対し、嗅球は平均 3.84 ppm で蓄積量が少なかったにも関わらずミクログリア 活性化や神経細胞損傷が惹起していた。一方、小脳は平均 2.94 ppm で他の領域の半分以下 であったことから、これがメチル水銀の影響が認められなかった一因である可能性がある。 しかし、小脳以外の領域では、メチル水銀が示す神経細胞傷害とその蓄積量には相関がなく、 メチル水銀による領域選択的な神経細胞傷害には未知の機構が関与していると考えられる。

4. メチル水銀によるミクログリア活性化に関わる因子の探索

活性化ミクログリアは細胞傷害性の側面(M1型ミクログリア)と細胞保護性の側面(M2 型ミクログリア)を持っている。そこで、M1 型ミクログリアで選択的に高発現している CD68 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、メチル水銀による神経細胞損傷が 認められた運動野において CD68 陽性細胞が増加していた。このことは、メチル水銀が細胞 傷害性の M1 型ミクログリアを活性化することで神経細胞傷害を惹起することを示唆して いる。これまでの検討により、メチル水銀は神経細胞(主に錐体細胞)の樹状突起に損傷を 与えており、この損傷にミクログリアが関与することが示唆されている。ミクログリアはシ ナプスと特異的に相互作用することで過度に形成されたシナプスの除去に関わっており、 本作用にはミクログリアで選択的に発現する CX3C 受容体 1 (CX3CR1) や C3 受容体と、 それらのリガンドである CX3CL1 や C3 が関与している。 CX3CL1 は主に神経細胞で恒常的 に発現しているケモカインで細胞膜結合型と可溶型(分泌型)が知られている。特に神経細 胞膜結合型 CX3CL1 は、ミクログリア細胞膜の CX3CR1 と結合することでミクログリアの 過剰な活性化を抑制している。一方、可溶型 CX3CL1 は神経細胞の傷害作用と保護作用を 有するがその詳細は不明である。そこで、免疫組織染色により運動野における CX3CL1 の 発現を調べた結果、野生型マウスに比べてメチル水銀曝露マウスにおいて CX3CL1 の発現 が低下しており、この発現低下は LMA マウスではほとんど認められなかった。これらのこ とは、メチル水銀が神経細胞での CX3CL1 の発現を低下させることでミクログリアを活性 化しており、この活性化が神経細胞の樹状突起損傷を惹起する可能性を示唆している。

IV 結論

30 ppm の塩化メチル水銀(メチル水銀として 24 ppm)をマウスに自由摂取させると、曝露 4 週目からミクログリア活性化が観察され、曝露 6 週目に神経細胞傷害と記憶障害(特に長期記 憶)が、曝露 8 週目に運動機能障害が惹起することが明らかになった。また、メチル水銀は M1 型ミクログリアを活性化させることで神経細胞に損傷を与え、これが記憶障害や運動機能障害 を惹起することが示唆された。さらに、メチル水銀は前頭前皮質、頭頂葉、運動野の他に、嗅球、 線条体および視覚野においてもミクログリア活性化を介して神経細胞傷害を惹起していること が示唆された。しかし、これらの領域選択的な神経細胞傷害はメチル水銀蓄積量に依存すること なく、未知の機構により惹起すると考えられる。メチル水銀による神経細胞傷害が認められた運動野においてミクログリアとシナプスの相互作用に関わる CX3CL1 の発現が低下しており、メ チル水銀は神経細胞の CX3CL1 とミクログリアの CX3CR1 間の相互作用を破綻させることでミ クログリアを活性化している可能性が示唆された。

V 今後の課題

上述のように、メチル水銀はミクログリアの過剰な活性化を抑止するCX3CL1/CX3CR1の 相互作用を破綻させることでミクログリアを活性化し、これが神経細胞損傷を惹起してい る可能性が示唆された。今後、CX3CL1/CX3CR1の相互作用を中心とした経時的な変化など をマウスの固体レベルで検討するとともに、マウス脳スライスや神経細胞とミクログリア の共培養系を用いてCX3CL1/CX3CR1を介したミクログリア活性化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

- Yamashita N Yokoyama Y Kumagai A Fukushima R Yamagata R Hwang GW. SRXN1 is a novel protective factor against methylmercury-induced apoptosis in C17.2 mouse neural stem cells. Toxicol Res 2025; 41:167-173.
- Yamashita N Uchiyama M Yamagata R Hwang GW. Methylmercury induces apoptosis in mouse C17.2 neural stem cells through the induction of OSGIN1 expression by NRF2. Int J Mol Sci 2024; 25:3886.
- Yamagata R Saito A Fukushima R Nakagawasai O Yamashita N Tan-No K Hwang GW. Methylmercury exposure at dosage conditions that do not affect growth can impair memory in adolescent mice. Toxicol Res 2024; 40:441-448.
- 4) 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.
- 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

- 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.
- 9) 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.
- 10) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. Environ Health Prev 2020; 25:30.
- 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.
- 12) 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-κB reduces methylmercury toxicity in C17.2 mouse neural stem cells. Environ Toxicol Pharmacol 2019; 71:103216.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

引用文献

- 1) Iemmolo M Ghersi G Bivona G. The cytokine CX3CL1 and ADAMs/MMPs in concerted cross-talk influencing neurodegenerative diseases. Int J Mol Sci 2023; 24:8026.
- Feng X Zhu S Qiao J Ji Z Zhou B Xu W. CX3CL1 promotes M1 macrophage polarization and osteoclast differentiation through NF-κB signaling pathway in ankylosing spondylitis in vitro. J Transl Med 2023; 21:53.

英文要約(Abstract)

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 observed short-term and long-term memory impairment in mice exposed to water containing methylmercury chloride (final concentration 30 ppm; approximately 24 ppm in methylmercury form) and found that microglial activation is involved in both forms of impairment. Previous research has suggested that methylmercury causes neuronal damage through an unknown mechanism that does not induce inflammatory cytokine expression in microglia. Despite this damage, no weight loss or decrease in spontaneous motor activity was observed in mice under these exposure conditions. We thus reconstructed a behavioral test system that can evaluate even minor decreases in motor function, and sought to clarify relationships between the effects of methylmercury on motor function and microglial activation. Almost no motor dysfunction or neuronal damage due to methylmercury was observed in a mouse model with low microglial activity (LMA mouse). Immunohistochemical staining of 12 regions of the extracted brain was performed. Our results suggested that methylmercury causes neuronal damage via microglial activation in the olfactory bulb, striatum, hypothalamus, visual cortex, prefrontal cortex, parietal lobe, and motor cortex. Our observations did not reveal any dependency of selective vulnerabilities of specific brain regions to methylmercury on the amount of accumulated methylmercury, suggesting that an unknown mechanism is involved. In the motor cortex, where neuronal injury caused by methylmercury was observed, the number of cytotoxic M1-type microglia increased, and neuronal expression of CX3CL1 decreased. Neuronal CX3CL1 inhibits excessive microglial activation by interacting with microglial CX3CR1. These results suggest that methylmercury activates microglia by disrupting the interaction between CX3CL1 and CX3CR1, which may cause neuronal damage.