

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障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、2021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」で得られた知見を踏まえて推進した。その結果、MeHg曝露により(1) 後根神経節 (DRG) にマクロファージが持続的に増加すること、活性型マクロファージは神経損傷が最も顕著な時期において一過性に増加すること、(2)集積したマクロファージはTNF- α を分泌することで神経損傷を増悪させている可能性があること、(3)*in vivo* DRGにおいて神経細胞死は起こっていなかったものの、それぞれの神経細胞が特異的かつ構造的に発現しているマーカー遺伝子については強く発現抑制がかかっていたこと、(4)その発現抑制は曝露後の回復期において須く回復したこと、(5)A線維の軸索損傷と軸索再生が起きていること、(6)先行研究で明らかとなっていた痛覚特異的鈍麻は末梢神経にその原因を求めることは現時点では困難であること、(7)マクロファージにおけるTNF- α の発現・分泌亢進にはMAPK経路ではなく、NF- κ Bの経路が寄与しており、(8)このマクロファージにおけるTNF- α の発現・分泌亢進が神経障害に影響を与えている可能性があること、などを明らかにした。一方で、末梢神経系において増加するマクロファージのMeHg曝露下における生理作用、痛覚特異的鈍麻の原因、末梢神経系における神経新生の有無、サテライトグリア細胞 (SGC) の神経新生およびその他に対する生理作用、上記イベントそれぞれに関連する分子メカニズムなど、新たな問いも生みだすことができた。以上のことから、本研究は水俣病における末梢神経障害の分子・細胞的基盤の包括的な理解に貢献するものであると考える。

I 研究目的

本研究採択前 6 年間で本助成事業の支援（鍛冶利幸代表）により得た研究成果により、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¹⁾、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²⁾、MeHg 投与により DRG へのマクロファージの集積が見られること³⁾、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⁴⁾などを見出した。これらの研究成果を踏まえ、本研究の目的は 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（図 1）。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、②痛覚特異性の病態基盤、③④回復期における神経新生の実態とその機構の解明を目指す。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。

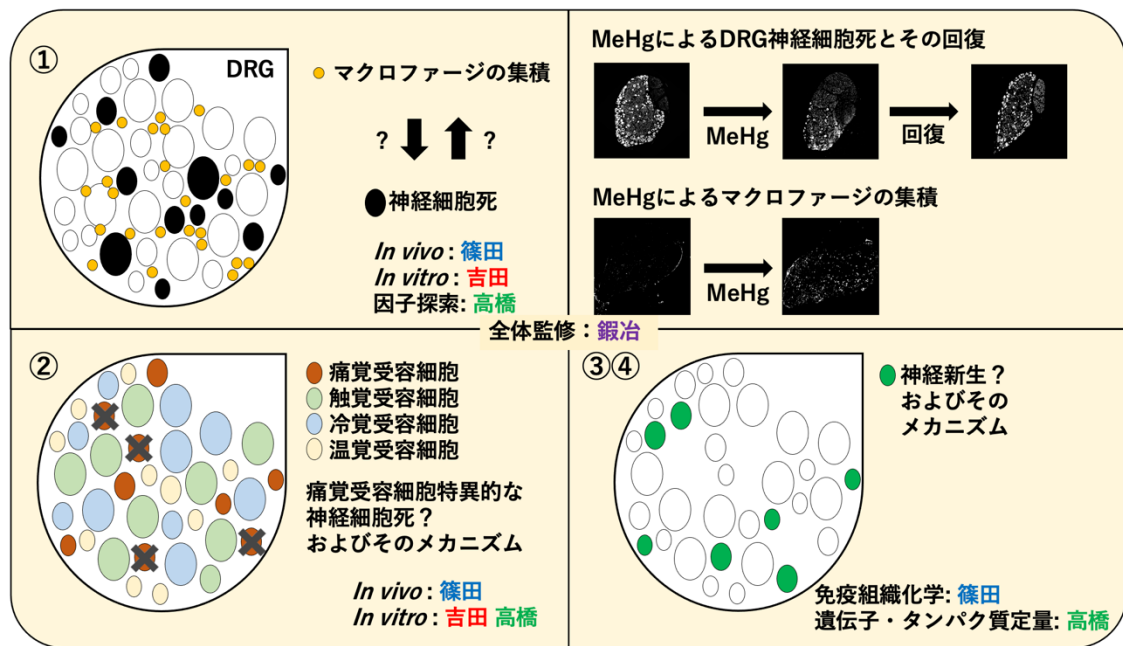


図1 本研究の概略図。①マクロファージ集積の末梢感覚神経障害に対する因果関係、②痛覚特異性の病態基盤、③④回復期における神経新生の実態とその機構の解明についての概略と担当者。

II 材料と方法

1. メチル水銀、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 および 100 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。TNF- α KO マウスへの MeHg 投与については、6-10 週齢の TNF- α KO マウスおよび野生型雄マウスを材料として 15 mg/kg/day の MeHg をゾンデにより経胃的に投与した。MeHg 投与は 5 日間投与 2 日間未投与、その後 1 日投与という条件で行った。

2. DRG および感覚神経線維、運動神経線維の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、細胞や軸索について ImageJ または視認による面積測定および計数を行い、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。

4. 神経細胞の培養と神経細胞死の評価

DRG 神経細胞、運動神経細胞(AHC)は、4 週齢の雄 Wistar Rat の胸椎から仙椎領域より定法により摘出して得た。ラットシュワン細胞は市販品を購入した。神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し、10% FBS-DMEM にて 7 日間培養した後、実験に使用した。メチル水銀は 1% BSA-DMEM を用いて 0.25, 0.5, 1, 3 および 5 μ M に調製し、TNF- α は 20 ng/mL に調製し曝露した。TNF 受容体のアンタゴニストである WPQ9Y (20 μ M) は DRG に 1 時間前処理した後、メチル水銀を 24 時間曝露した。細胞生存率については Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を、細胞死の様態については TUNEL 染色および AnnexinV-FITC/PI 染色と FACS にて評価した。また、種々細胞死に関連するタンパク質発現解析についてはウエスタンブロットにより評価した。

5. TNF- α KO マウスの病態評価と水銀の組織蓄積量の評価

MeHg 投与開始 9 日目に尾懸垂した際の後肢踵間距離を評価した。距離測定後深麻酔下で各種臓器 (DRG、大脳、小脳、肝臓、腎臓、心臓、血液) を摘出した。摘出したサンプルは定法に従って処理し、ICP-MS にて組織蓄積 Hg 量について定量評価した。

(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および電力中央研究所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。メチル水銀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. MeHg 投与による DRG 神経細胞および軸索の経時変化

以前までの研究で、MeHg 投与 7 日 (Day 7) および 14 日 (Day 14) の神経細胞マーカー Neurofilament heavy chain (NEFH) の免疫染色による結果より、Day 14 において NEFH 陽性細胞数の顕著な減少が観察されていたが、その後の調査により NEFH 陽性細胞は DRG 神経細胞の一部のみ (機械受容細胞のみ) であり、神経細胞全体の定量評価とならないことが明らかになった⁵⁾。そこで全神経細胞数を経時的に評価する目的で、MeHg 投与後 70 日の間の各標本について全神経細胞を染色するマーカー NeuN 抗体で免疫染色し、全神経細胞数の経時変化について定量評価した。その結果 Day 7, 14, 28 付近で多少の減少傾向が見られるものの有意差はなく、当初の予想に反して神経細胞数は減少していなかった (未発表データのため図は省略)。

次に感覚神経線維の経時変化について、冠状断切片を用いて NEFH による免疫染色を行い、C 線維 (直径 1.7 μm 未満) および A 線維 (直径 1.7 μm 以上) をその断面積で分類して定量評価を行った。単位面積あたりの神経線維数を比較したところ、C 線維の数は有意な差が見られなかったものの、A 線維の数は Day 14~56 において有意に減少し、その後回復した (未発表データのため図は省略)。

また、線維の平均断面積について比較したところ、C 線維の断面積には変化がなかったものの、A 線維の断面積は Day 14 において有意に増加した。これは、軸索のワーラー変性による損傷性膨大が原因であると考えられた。またこの軸索膨大も経時的にコントロールレベルまで回復した (未発表データのため図は省略)。

2. MeHg 曝露による神経細胞サブファミリー特異的マーカーの経時変化

前述のとおり、先行研究において NEFH 陽性細胞数が Day 14 において顕著に減少することが観察されていた³⁾。一方で、1 の項目で示した通り全神経細胞数は変化が見られなかった。この一見矛盾とも思われる現象を詳細に調査する目的で、DRG における神経細胞サブファミリーを免疫組織化学的に同定し、その数の経時変化を解析し比較した。機械受容細胞マーカーである NEFH 抗体で染色し、陽性細胞数の経時変化を評価したところ、先行研究の結果同様 Day 14 で有意な陽性細胞数の減少が認められ、その後 Day 70 に向かってその数を増加させた (未発表データのため図は省略)。

また、主に痛覚受容を担当していることが知られている感覚神経細胞サブファミリーをそれぞれ TrkA、FAM19A1、TAC1、SST 抗体で染色し、TrkA⁺/FAM19A1⁺/TAC1⁺、SST⁺、

TAC1⁺、TAC1⁺/FAM19A1⁺で分別して計数したところ、いずれの細胞数も NEFH 陽性細胞と同様の時系列で減少と回復を示した（未発表データのため図は省略）。

以上のことから、本実験条件においては DRG 神経細胞数そのものの変化は伴わず、各種神経細胞サブファミリー特異的マーカータンパク質の発現レベルが Day 14 を中心に顕著に減少し、その後漸次回復するということが示唆された。このことは DNA マイクロアレイを用いた Day 14 における各種神経細胞サブファミリー特異的マーカー遺伝子発現レベルの比較でも同様に示されており、免疫組織化学で標的にしたタンパク質以外の特異的マーカー遺伝子も須く発現低下していることから裏付けられた（未発表データのため図は省略）。

3. MeHg 投与による DRG マクロファージおよび活性型マクロファージの経時変化

以前までの研究で、Day 14 にマクロファージが DRG および神経線維領域に集積することを明らかにしていた。しかしながらこの集積マクロファージの細胞数について、その後の経時変化は明らかになっていなかった。さらに、活性型マクロファージは CD68 陽性細胞として同定可能であるため、同抗体を用いた活性型マクロファージ数についても経時観察を行った。MeHg 投与によるマクロファージ総数の経時変化を投与開始時より 70 日 (Day 70) まで追跡したところ、Iba1 陽性細胞数は Day 14 に有意に増加し、その細胞数は Day 70 まで持続的に増加していた。一方 CD68 陽性細胞数は Day 14 から 28 にかけて一過性に増加し、その後漸次定常数に戻っていた（未発表データのため図は省略）。

4. マクロファージ活性抑制による MeHg 誘発性神経細胞損傷への影響

マクロファージ集積および活性化の末梢感覚神経損傷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活性化抑制剤であるミノサイクリンを 30 mg/kg/day で MeHg 投与期間中毎日投与した。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差がなかった。同様の実験を 100 mg/kg/day で投与して行ったが、こちらにおいても同様に、Iba1 陽性マクロファージ総数および CD68 陽性マクロファージ数はコントロール群と比較して差が見られなかった（未発表データのため図は省略）。

同様に、ミノサイクリン投与による神経細胞数に対する影響についても比較を行なったが、こちらもミノサイクリン投与による影響は見られなかった（未発表データのため図は省略）。

5. DRG における神経新生の可能性探索

1 の項目において神経細胞死は観察されなかったが、一方で Day 14 以降有意差はない

ものの神経細胞数の緩やかな増加が観察されること、また、定性的ではあるものの見た目が健康な神経細胞数が MeHg 投与後経時的に増加している印象があること、さらに、少ないながらも DRG において末梢神経損傷時に神経新生が報告されていること⁶⁾などから、MeHg 曝露後その回復期において神経新生が起こっている可能性を考え、細胞増殖マーカーBrdU を用いて神経新生の可能性について検討を行った。MeHg 投与時より5日間/週間で毎週 BrdU を 100 mg/kg/day で腹腔内投与し、BrdU 投与開始1週間後に固定した DRG 切片標本を用いて観察を行ったところ、BrdU 陽性細胞は各サンプルにおいて観察されたものの、各種神経細胞マーカーで共染色される細胞は見出すことができなかった（未発表データのため図は省略）。

一方で、細胞分裂中に発現する Ki67 と神経細胞マーカーで染色したサンプルにおいて、MeHg 曝露後に少数ではあるものの Ki67 陽性ニューロンが観察された（未発表データのため図は省略）。

6. 感覚神経優位な MeHg 感受性とその損傷メカニズム

感覚神経細胞優位な MeHg 感受性とその損傷メカニズムを明らかにするために、DRG 神経細胞、AHC 神経細胞、シュワン細胞由来の初代培養細胞を MeHg に曝露し TUNEL 染色による評価を行ったところ、DRG 神経細胞が最も感受性が高く、アポトーシスによる細胞死が観察された。一方で AHC 神経細胞およびシュワン細胞は同程度の MeHg 濃度での細胞死はあまり見られなかった（図 2）。同様に、AnnexinV-FITC/PI アッセイを行ったところ、アポトーシスおよびネクロトーシス/ネクローシスによる細胞死が観察された（図 3）。

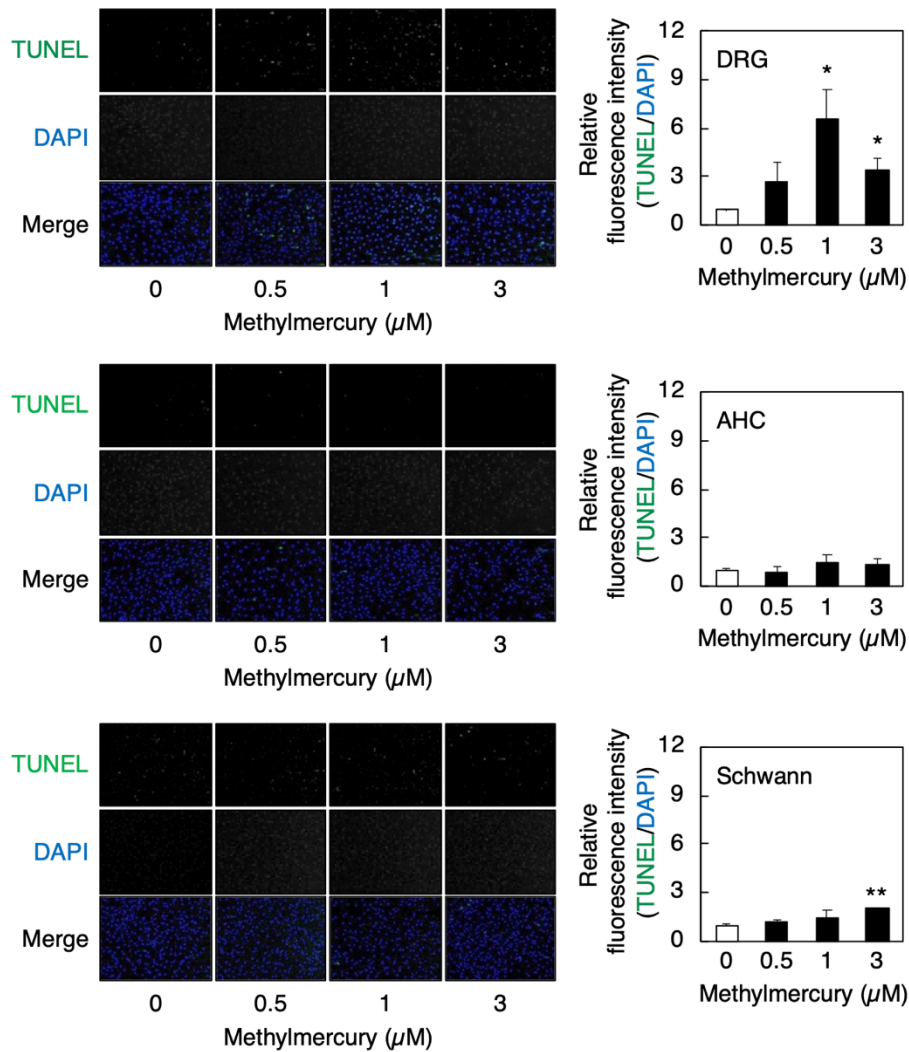


図2 DRG, AHC 神経細胞およびシュワン細胞の TUNEL 染色による MeHg 感受性評価
DRG が 1 μM の濃度で TUNEL 陽性細胞数の増加を示すのに対し、AHC およびシュワン細胞ではその増加が見られなかった(Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より引用)。

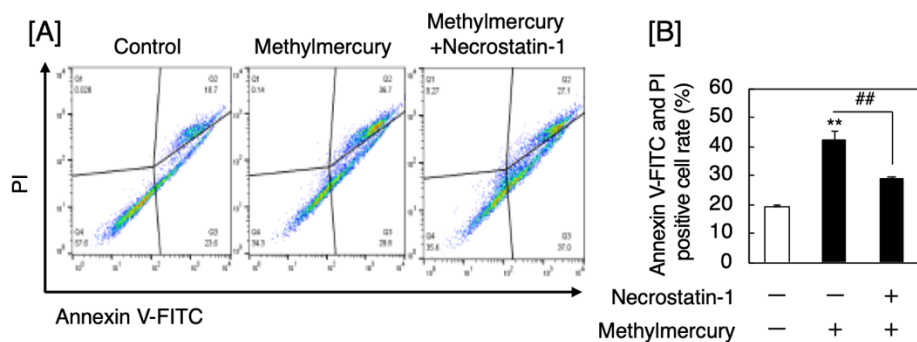


図3 FACS によるアポトーシスおよびネクロトーシス/ネクローシスの検証 (A)FACS の結果。(B) Annexin V-FITC および PI 両陽性細胞比率。MeHg 曝露によりアポトーシスおよびネクロトーシスが観察された(Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より引用)。

また、ウェスタンブロッティングによる検証でも、アポトーシス関連因子である Caspase 3 および 8 の活性化と、ネクローシス関連因子である RIP3、MLKL の活性化が観察され、こちらでも DRG 神経細胞はアポトーシスおよびネクローシスを引き起こしていることが示唆された (図 4)。

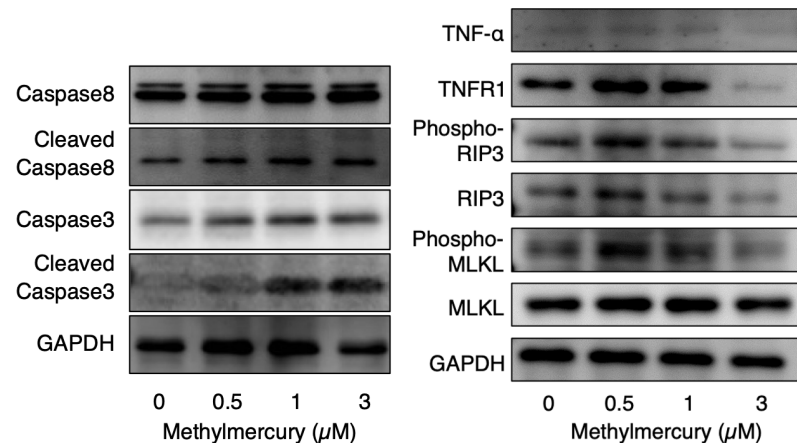


図 4 MeHg 曝露によるアポトーシスおよびネクローシス関連因子の活性化が観察された(Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より引用)。

ネクローシス誘導経路の一つとしてマクロファージ由来サイトカインの一つである TNF-α が存在する。3 の項目で示されたように、*in vivo* では MeHg 曝露依存的に DRG でのマクロファージ集積が観察される。また、我々は MeHg 曝露ラットの小脳における顆粒細胞の細胞死は、小脳顆粒細胞層に浸潤したマクロファージからの TNF-α 分泌が顆粒細胞の細胞死を増悪していることも報告していた⁸⁾。そこでマウス由来マクロファージ細胞 RAW264.7 を用い、MeHg 曝露による TNF-α 発現・分泌が亢進するかどうかについて検討を行ったところ、処理時間依存的、濃度依存的に TNF-α の発現・分泌が亢進した (図 5)。

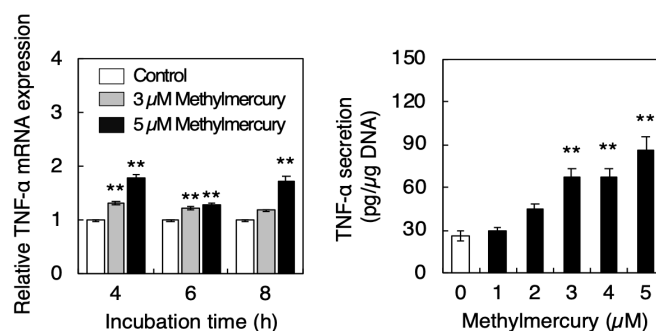


図 5 マウス由来マクロファージ様 RAW264.7 細胞の MeHg 曝露による TNF-α の発現および分泌。処理濃度・時間依存的に TNF-α の発現および分泌が増加した(Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より引用)。

また、この TNF- α 発現・分泌亢進機構を明らかにする目的で、亢進経路として知られている MAPK 経路の関与についてウエスタンブロッティングおよび阻害剤実験により検証した。RAW264.7 細胞を MeHg 曝露すると濃度依存的に ERK1/2 や p38 MAPK のリン酸化は亢進したが、種々 MAPK/ERK 阻害剤では TNF- α の発現・分泌は変動しなかった (図 6)。

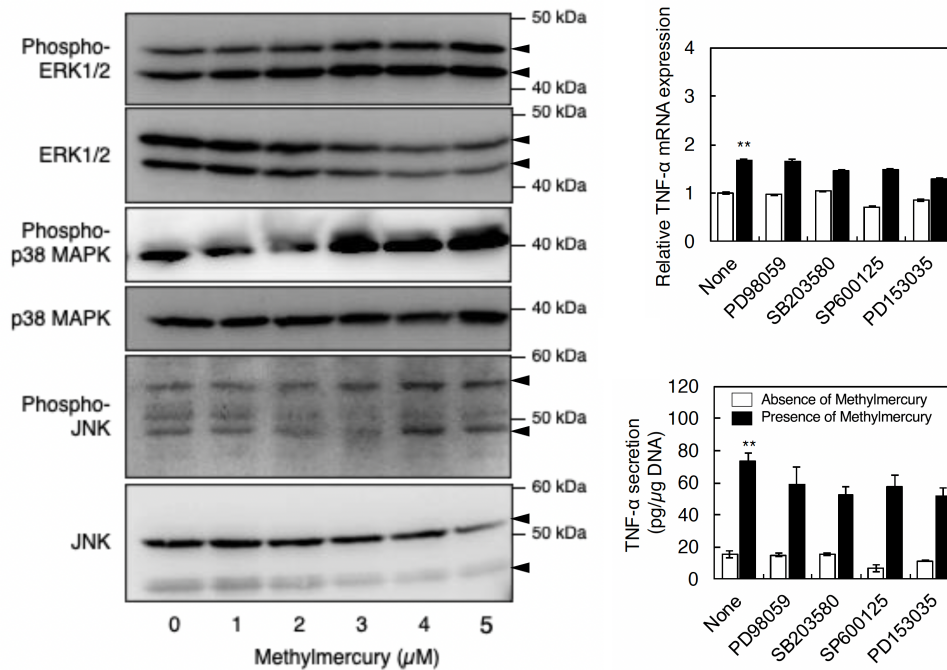


図 6 RAW264.7 細胞の MeHg 曝露による TNF- α の発現および分泌への MAPK/ERK 経路の寄与はほとんどなかった(Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より改変引用)。

一方、TNF- α 発現亢進の別の経路として知られている NF- κ B 経路の寄与について調べたところ、NF- κ B の阻害因子である I κ B α のリン酸化および NF- κ B の核移行が観察された。また、これは I κ B α キナーゼ阻害剤 (BAY11-7082) 処理または NF- κ B のサブコンポーネントである p65 をノックダウンすることで、TNF- α の分泌量が低下することでも確認された (図 7)。

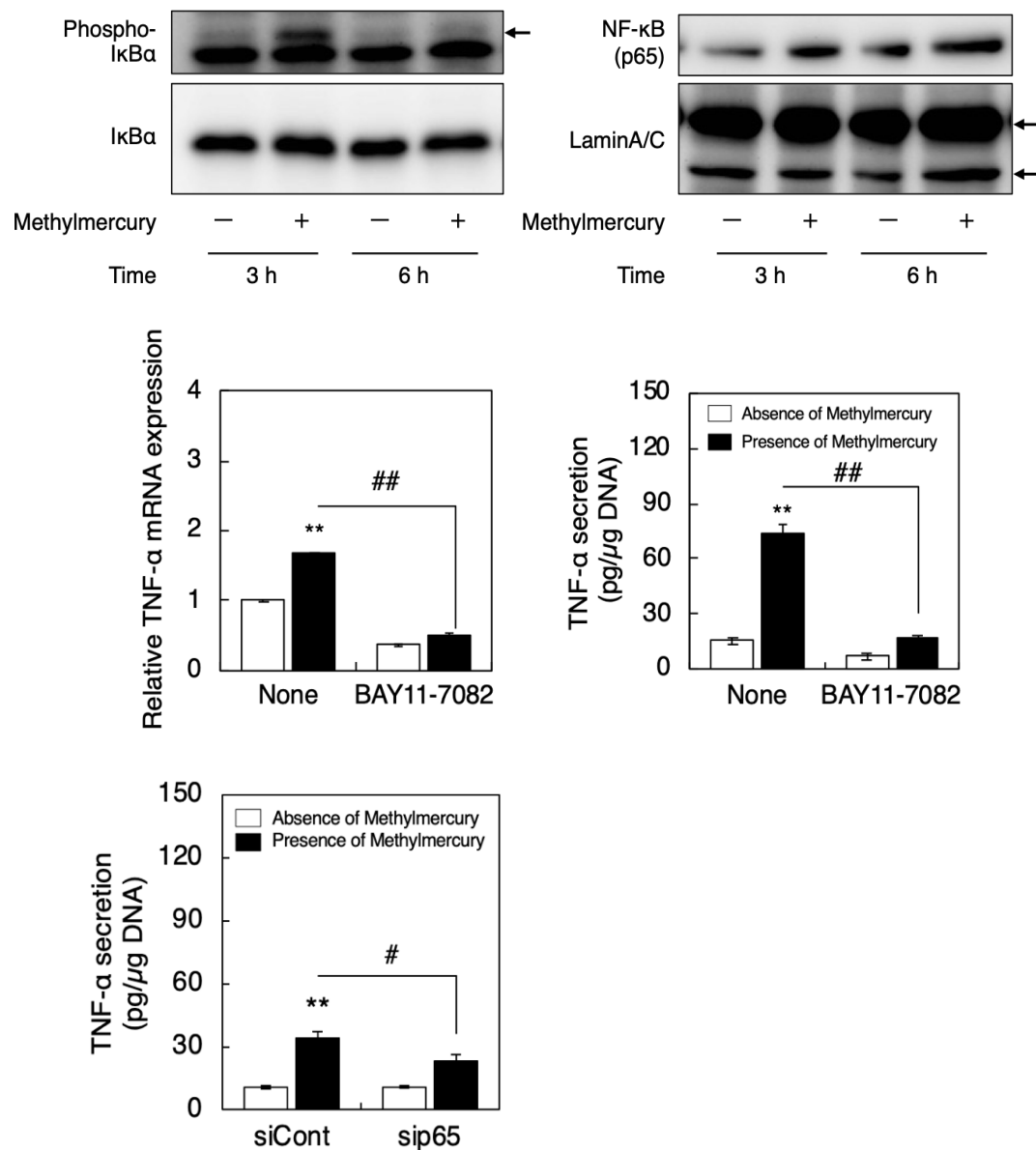


図 7 RAW264.7 細胞の MeHg 曝露による TNF-α の発現および分泌への NF-κB の寄与 (Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より改変引用)。

次に、TNF-α が生体においても MeHg による障害に寄与するかどうかを明らかにする目的で、TNF-α KO マウスに MeHg を投与し、尾懸垂時の後肢踵間距離を測定することで、神経障害の程度について定量評価したところ、野生型で強く観察された後肢踵間距離の減少は TNF-α KO マウスにおいて消失していた (図 8)。また、TNF-α KO マウスに後肢踵間距離の減少が観察された時点における DRG、大脳、小脳、肝臓、腎臓、心臓および血液における水銀蓄積量を測定したところ、どの組織においても野生型と比較して大きな差は見られなかった (図 8)。

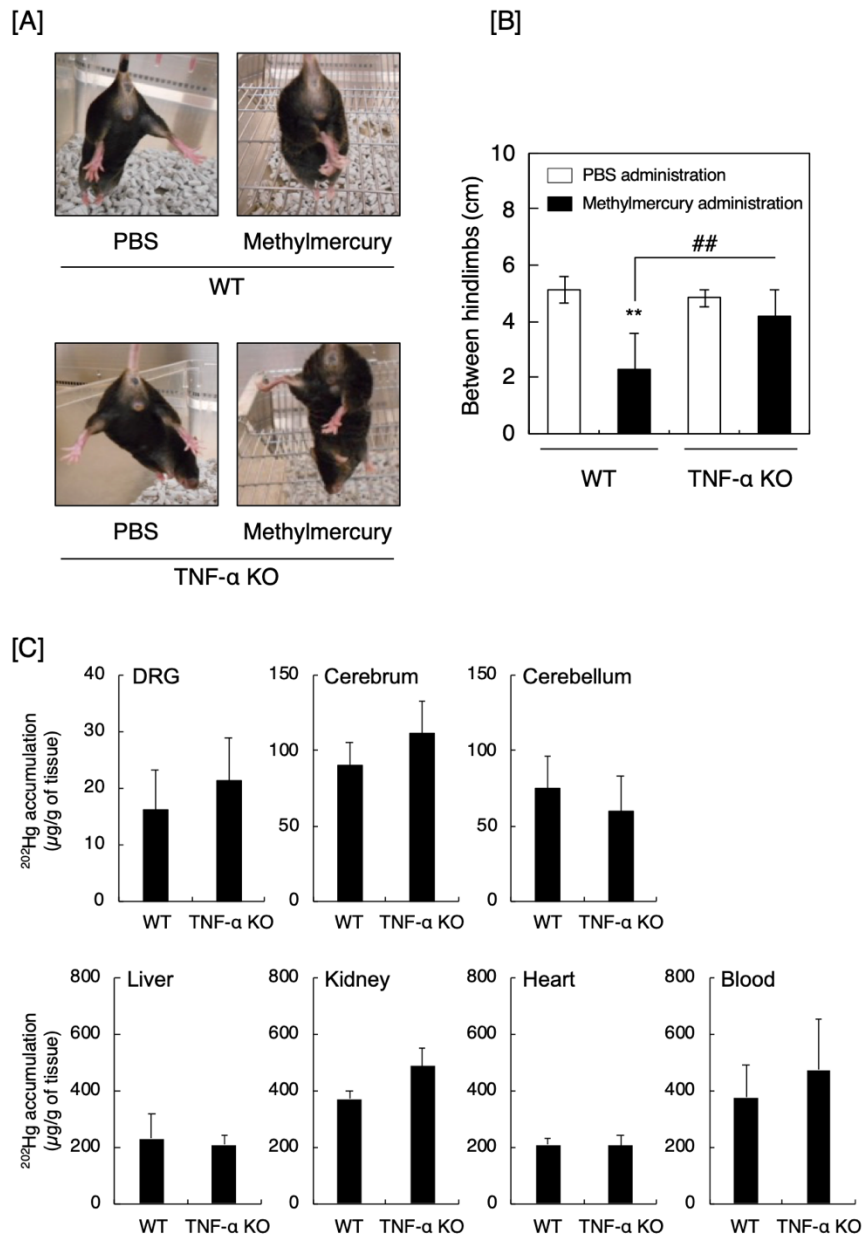


図 8 MeHg 曝露 TNF-α KO マウスの後肢踵間距離と組織内 Hg 蓄積量 (Nakano *et al.*, 2024⁷⁾より改変引用)。

IV 考察

1. MeHg 投与による DRG 神経細胞および軸索の経時変化と痛覚特異的鈍麻との関連性
本実験条件において、DRG 神経細胞数は影響を受けないものの、軸索数とりわけ A 線維数の顕著な減少と断面積の病的膨大が観察され、またこれらが経時的に回復することが示された。この軸索障害とその後の再生は水俣病患者でも観察されているものであり、ヒトにおける MeHg 曝露による病理変化を再現しているものと考えられた。また、先行

研究で観察されていた痛覚特異的鈍麻について、当初末梢神経における病理解析からの説明可能性を企図していたが、痛覚受容細胞のみならず機械受容細胞も含め全神経細胞サブファミリーの特異的遺伝子発現レベルが同様の時系列で変動すること、また、軸索損傷とその回復は A 線維を中心に観察されたものの、ワーラー変性による軸索膨大が見られることから、病理学的解析では痛覚を担当する A δ 線維を分離同定しづらいこと、C 線維には変化がないこと、神経細胞自体は細胞死を引き起こさないことなどから、少なくとも本実験条件で観察された痛覚特異的鈍麻の原因を末梢神経系に求めることは困難であると考えた。現在は本実験条件で得られた痛覚特異的鈍麻の原因を中枢神経系に求め、研究を進めている。

2. MeHg 投与による DRG マクロファージおよび活性型マクロファージの経時変化

MeHg 投与ラット DRG におけるマクロファージ動体について経時的解析を行ったところ、全マクロファージ数は MeHg 投与後持続的に増加し、一方 CD68 陽性マクロファージは一過性に増加してその後定常状態となった。これらマクロファージ動態は神経細胞をはじめとした細胞損傷に伴う炎症応答である可能性もあるが、一方でマクロファージは周囲の細胞環境を調整し、さまざまに起こる細胞損傷を抑制する働きも有するため、MeHg 投与により増加・活性化したマクロファージの DRG 神経細胞および神経線維に対する作用について阻害剤による実験を行った。マクロファージ活性化阻害剤であるミノサイクリンを投与して実験を行ったところ、少なくとも Iba1 陽性細胞数および CD68 陽性細胞数に顕著な変化はみられなかった。ミノサイクリンはマクロファージの遊走活性を低下させることが知られているため、Iba1 陽性細胞数が低下するものと考えていたが、少なくとも本実験条件ではそのような現象を観察することができなかった。一方で、ミノサイクリンは種々サイトカインの発現および分泌活性を低下させ、かつ貪食活性を低下させることが知られているため、現在はそのような活性抑制が達成されているかどうかについて検討を進めている。さらに並行して、ミノサイクリン投与により MeHg 曝露による神経細胞サブファミリー特異的マーカーの発現パターンや、感覚神経線維の組織学的変容に影響があるかどうかについて、現在解析を進めているところである。

3. DRG における神経新生の可能性探索

MeHg 曝露後の回復期において、DRG 神経細胞が新生している可能性について検討を行ったが、現時点では神経新生であると結論できる現象を見出せていない。BrdU 陽性細胞は観察することができたが、この増殖した細胞は主にシュワン細胞と神経細胞周囲を密に取り巻いている細胞であるサテライトグリア細胞 (SGC) であると考えられた。本結果は各サンプルステージともに BrdU 投与開始から 1 週間後に固定したために、分裂細胞が神経細胞に分化・成熟する十分な時間がなかった可能性が考えられるため、現

在 BrdU 投与後十分に期間を置いたサンプルを作成し、神経新生が観察されるかについて検討を進めている。一方、細胞分裂期マーカーである Ki67 陽性となる成熟ニューロンが観察された。これは病的な細胞状況における制御不能な発現である可能性もあるものの、成熟神経細胞で発現する意味や機能については興味深い。

4. 感覚神経優位な MeHg 感受性とその損傷メカニズム

感覚神経優位な MeHg 感受性を検討する目的で、ラット由来 DRG, AHC 神経細胞とシュワン細胞を培養し、MeHg 感受性について調べたところ、DRG が最も MeHg に対して脆弱であることがわかった。またその際の細胞死の容態についてはアポトーシスおよびネクローシスを含むことが明らかとなった。この感覚神経優位な細胞死誘導メカニズムの一つとして、我々は MeHg の細胞内取込みに関与している LAT1 の構成的発現が DRG ニューロンにおいて高く、細胞外排出に関与している MRP2 の構成的発現が低いことを報告している¹⁾。また、この神経細胞死に集積マクロファージがどのように寄与しているかを *in vitro* で明らかにする目的でマウス由来マクロファージ様細胞に MeHg を曝露し、炎症性サイトカインの一つである TNF- α の発現および分泌量を検討したところ、いずれも MeHg 曝露により増加した。またこの発現・分泌増加には NF- κ B 経路が関わっていることが示唆された。これは *in vivo* で観察された DRG へのマクロファージ集積、またすでに報告した小脳顆粒細胞層へのマクロファージ集積⁸⁾と関連すると考えられる。さらに、TNF- α KO マウスを用いた実験において神経障害の低下が観察されたことから、MeHg による神経障害機構に TNF- α が重要であることが示唆された。また、少なくとも *in vivo* での DRG においてはマクロファージの集積と活性化は認められたものの明確な神経細胞死は観察できなかったため、今後は *in vitro* で観察される細胞死が *in vivo* で観察されなかった原因を明らかにするとともに、神経細胞死ではない、神経細胞の構成的遺伝子発現の増減に与える影響についても調査検討する予定である。

V 結論

本研究では、MeHg 曝露ラット DRG において病理学的な観点からどのような現象が起きているかについて経時変化を明らかにすると同時に、培養細胞を用いてその神経細胞損傷の詳細なメカニズム解析を行った。本実験条件において、MeHg 曝露により(1) DRG にマクロファージが持続的に増加し、また活性型マクロファージは神経損傷が最も顕著な時期において一過性に増加すること、(2)集積したマクロファージは TNF- α を分泌することで神経損傷を増悪させていること、(3)*in vivo* DRG において神経細胞死は起こっていなかったものの、それぞれの神経細胞が特異的かつ構成的に発現しているマーカー遺伝子については強く発現抑制がかかっていたこと、(4)その発現抑制は曝露後の回復期において須く回復したこと、(5)A 線維の軸索損傷と軸索再生が起きていること、(6)先行研究で明らかとなっ

いた痛覚特異的鈍麻は末梢神経にその原因を求めることは現時点では困難であること、(7)マクロファージにおける TNF- α の発現・分泌亢進には MAPK 経路ではなく、NF- κ B の経路が寄与しており、(8)このマクロファージにおける TNF- α の発現・分泌亢進が神経障害に影響を与えている可能性があること、などを明らかにした。一方で、神経新生が起こっているかどうかについては、成熟神経細胞における Ki67 の発現亢進という興味深い現象は見出したものの、現時点では確証を得ることができなかった。以上のように、末梢神経系に対する MeHg の毒性発現メカニズムについて、経時的病理解析および細胞生物学的、分子生物学的解析によって多くのことを明らかにすることができ、さらに研究を要する現象もまた多く得られたと言える。

VI 今後の課題

本研究において末梢神経系における MeHg の毒性発現に関する病理学的および分子細胞学的な知見を多く積み上げることができた。しかしながら依然として MeHg による末梢感覚神経の毒性発現機構およびその関連領域に関する問題がすべて明らかになったとは言えず、以下の本研究で見出された新規のあるいは未解決の課題について、さらなる検討と解決が必要であると思われる。

- (1) 神経細胞の特異的かつ構成的なマーカー遺伝子発現の総体的減少とその回復の生理学的、毒性学的意義
- (2) 神経新生の有無や軸索再生の分子細胞学的機構
- (3) *in vitro* で神経細胞死が起き、*in vivo* で起きなかった原因の探索
- (4) (1)(2)(3)の現象に対する集積マクロファージの影響
- (5) *in vivo* における TNF- α の(1)(2)(3)に対する寄与
- (6) 痛覚特異的鈍麻を引き起こした原因についての中枢神経系における解析

上記(1)(2)についてはすでに新たな実験条件や既存のサンプルを用いた解析を開始している。また、(2)の神経新生についてはその神経幹細胞となりうる細胞候補として、DRG に豊富に存在するサテライトグリア細胞(SGC)の脱分化・再分化によるものが複数報告されているため、SGC に標的を絞った MeHg 曝露後の神経新生の可能性について探索を行う。現在 SGC に選択的に Cre を発現するラットの作成および Cre 依存的に蛍光タンパク質 tdTomato を発現するラットの譲渡契約を進めている。(3)については *in vivo* DRG の神経細胞にどの程度の MeHg が到達していたかについて SPring-8 における蛍光 X 線解析により明らかにすると同時に、*in vitro* では SGC リッチな培養系を用いて毒性評価を行う。(4)についてはミノサイクリンを投与した現サンプルを含め、他剤によるマクロファージの活性抑制による効果についても検証を行う。(5)は TNF- α KO マウスを用いることで、種差の存在がある可

能性はあるものの、KOマウスの組織学的表現型について、末梢神経および中枢神経系の両側面から解析が可能であると考え。 (6)についても現在脳サンプルの解析を開始していると同時に、光シート顕微鏡を用いた全脳解析による原因脳領域の同定についても企画を進めているところである。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 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).
- 2) 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).
- 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) Du K, Hirooka T, Sasaki Y, Yasutake A, Hara T, Yamamoto C, Fujiwara Y, Shinoda Y, Fujie T, Katsuda S, Eto K, Kaji T. Pathogenesis of selective damage of granule cell layer in cerebellum of rats exposed to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **48**, 429-439 (2023).
- 5) Shinoda Y, Akiyama M, Toyama T. Potential association between methylmercury neurotoxicity and inflammation. *Biol. Pharm. Bull.*, **46**, 1162-1168 (2023).
- 6) Yoshida E, Aoki K, Sasaki Y, Izuhara H, Takahashi T, Fujiwara Y, Fujie T, Du K, Eto K, Shinoda Y, Kaji T. Comparative study of susceptibility to methylmercury cytotoxicity in cell types composing rat peripheral nerves: A higher susceptibility of dorsal root ganglion neurons. *J. Toxicol. Sci.*, **49**, 241-248 (2024).
- 7) Nakano T, Yoshida E, Sasaki Y, Kazama S, Katami F, Aoki K, Fujie T, Du K, Hara T, Yamamoto C, Takahashi T, Fujiwara Y, Eto K, Iwakura Y, Shinoda Y and Kaji T. Mechanisms underlying sensory nerve-predominant damage by methylmercury in the peripheral nervous system. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 11672 (2024).

引用文献

- 1) Yoshida E, Aoki K, Sasaki Y, Izuhara H, Takahashi T, Fujiwara Y, Fujie T, Du K, Eto K, Shinoda Y, Kaji T. Comparative study of susceptibility to methylmercury cytotoxicity in cell types composing rat peripheral nerves: A higher susceptibility of dorsal root

- ganglion neurons. *J. Toxicol. Sci.*, **49**, 241-248 (2024).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Zhang L, Xie R, Yang J, Zhao Y, Qi C, Bian G, Wang M, Shan J, Wang C, Wang D, Luo C, Wang Y, Wu S. Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from sox2-positive satellite cells. *Glia*, **67**, 1062-1075 (2019).
- 7) Nakano T, Yoshida E, Sasaki Y, Kazama S, Katami F, Aoki K, Fujie T, Du K, Hara T, Yamamoto C, Takahashi T, Fujiwara Y, Eto K, Iwakura Y, Shinoda Y, Kaji T. Mechanisms underlying sensory nerve-predominant damage by methylmercury in the peripheral nervous system. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 11672 (2024).
- 8) Du K, Hirooka T, Sasaki Y, Yasutake A, Hara T, Yamamoto C, Fujiwara Y, Shinoda Y, Fujie T, Katsuda S, Eto K, Kaji T. Pathogenesis of selective damage of granule cell layer in cerebellum of rats exposed to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **48**, 429-439 (2023).

英文要約 (Abstract)

Minamata disease, also known as Hunter-Russell syndrome, is a central nervous system disorder primarily studied for its methylmercury (MeHg) toxicity in the central nervous system. However, research on peripheral nerve damage—especially sensory nerve damage observed in the early stages of Minamata disease—remains limited. This study builds upon the findings of the project Methylmercury-induced peripheral sensory neuropathy, selective impairment of pain perception, and its recovery, conducted under the Comprehensive Research on Minamata Disease initiative.

Our results demonstrate that MeHg exposure leads to a persistent increase in macrophages within the dorsal root ganglia (DRG), with active macrophages peaking during periods of significant nerve damage. These accumulated macrophages may exacerbate nerve injury by secreting TNF- α . Although *in vivo* studies did not show neuronal cell death in DRGs, we observed a strong downregulation of marker genes specifically expressed by neurons, which restored during recovery. Additionally, axonal damage and subsequent regeneration of A fibers were identified. However, the role of peripheral nerves in the selective blunting of pain perception remains inconclusive. Further investigation revealed that the NF- κ B pathway, rather than the MAPK pathway, plays a critical role in enhancing TNF- α expression and secretion in macrophages, potentially influencing neurological disorders.

Our study also raises new questions regarding the physiological effects of MeHg exposure on peripheral macrophages, the mechanisms underlying pain-specific blunting, and the potential for neurogenesis in the peripheral nervous system. Understanding the molecular pathways and physiological responses involved provides deeper insight into the peripheral neuropathy associated with Minamata disease, contributing to a more comprehensive understanding of its pathophysiology.