

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

メチル水銀 (MeHg) 投与による脳内神経細胞死惹起部位に関しては、大脳皮質や線条体で認められるものの、他領域における多角的な解析は報告されていない。そこで、MeHg 曝露脳切片を用いて、TUNEL 染色を実施し、陽性細胞の有無を詳細に検討したところ、新たに嗅球や嗅覚伝導路を担う大脳皮質部位にアポトーシス様の細胞死を認めた。

これまで、MeHg 曝露がマウス脳においてニューロン特異的に小胞体 (ER) ストレスを誘導し、アポトーシスを惹起することを明らかにしてきた。初期的な検討から、ER ストレスを軽減するケミカルシャペロン (4-フェニル酪酸 (4-PBA)) は、MeHg による ER ストレス応答 unfolded protein response (UPR) を抑制するだけでなく、神経症状 (後肢伸展障害) も有意に抑制することを発見した。そこで、その有効性 (治療時間枠) をさらに明らかにするために、4-PBA の治療可能時間域について解析した。その結果、MeHg 投与後 2 週目からの投与でも有意に神経症状を回復させることがわかった。

I 研究目的

これまでに MeHg 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ものの、水俣病治療に関する明確な方針や治療薬シーズが提示されているとは言い難い状況である。申請者は、マウスにおける MeHg 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、ER ストレスを介して惹起されることを証明してきた¹⁻³。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⁴。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した。一方、この薬物は MeHg 曝露前に投与しており、「治療」という側面からは、効果を発揮する候補物質とは判断できない。そこで、治療薬としての可能性を明らかにするため、4-PBA の治療可能時間域を追求した。また、MeHg を曝露させたマウス脳における新規神経細胞死部位／領域を明らかにすることとその病態生理学的意義の解明を試みた。

II 材料と方法

1. 材料

C57BL/6 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±2℃、湿度 50±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:041116 および 050315-1), 当センターの規定に基づき実施した。

ER stress-activated indicator (ERAI)-Venus/LUC Tg 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^{5,6}。飼育条件は, コンベンショナル条件下, 室温 23±2℃, 湿度 50±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。ERAI-Venus Tg 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:050912 および 051221), 当センターの規定に基づき実施した。

2. 薬物投与

1) MeHg 飲水投与

塩化 MeHg 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 MeHg 含有飲水を調製した。これを給水ボトルに入れ, 雄性 CHOPKO マウスに自由摂取させた。コントロール群には, MeHg 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。

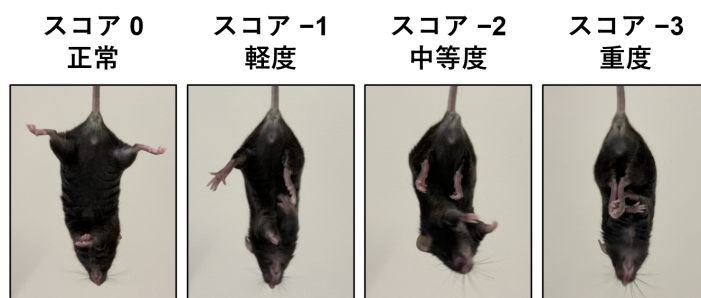
2) 4-Phenylbutyric acid (4-PBA) の腹腔内投与

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。

3. 後肢伸長反応の観察

MeHg 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 MeHg 曝露による神経障害を評価した。

両後肢が体側から大きく外側に広がる場合を 3 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, -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)。



4. 組織中総水銀量の測定

MeHg 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。

5. 免疫組織染色

1) パラフィン包埋脳切片の作製

MeHg 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。回転式ミクロトーム (Leica) を用い、パラフィン包埋脳組織から 5 μ 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×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×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 μ L を添加し、室温で 20 分間静置した。PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後、Primary antibody solution 250 μ L を切片に添加し、室温で 30 分間静置した。PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後、Secondary antibody solution 250 μ L を切片に添加し、室温で 30 分間静置した。PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後、ABC reagent 250 μ L を切片に添加し、室温で 30 分間静置した。PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後、Substrate working solution 250 μ 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×3 回静置し、脱水処理を行った後、キシレン中で 5 分間×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。

6. 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 μL 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 μL 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 μL 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。

7. 統計解析

データは平均値 $\pm$ 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(承認番号: 041116 および 050315-1(嗅覚系研究), 承認番号: 050912 および 051221 (4-PBA 研究))で承認を受けた。

III 研究結果

1. MeHg による嗅覚系神経障害惹起

嗅覚系に対する MeHg の影響を調べるため、亜慢性 MeHg 毒性モデルを樹立した(図 1a)．以前の研究結果と一致して⁷，MeHg に 8 週間曝露したマウスは，大脳皮質に顕著な水銀の蓄積を示し，一次運動皮質では NeuN 陽性細胞の減少を認めた．さらに，マウスは MeHg 曝露 5 週後に後肢障害を示し，この障害は 8 週目に悪化する傾向があった．この投与方法では，マウスは MeHg 曝露後 10 週以内に死亡した．これらの結果から，MeHg に 8 週間曝露したマウスは，脳障害やその他の病態を解析するのに十分な中毒レベルに達したと判断した．嗅覚系は主に，においを受け取る OSN を含む嗅上皮，OSN の投射部位である嗅球，嗅球からの投射を受け取る嗅皮質から構成される(図 1b)．MeHg に 8 週間曝露されたマウスは，鼻粘膜，嗅球，嗅皮質(OT と PIR)に有意な水銀蓄積を示した(図 1c)ことから，MeHg は曝露後，嗅覚経路に広く分布することが示唆された．

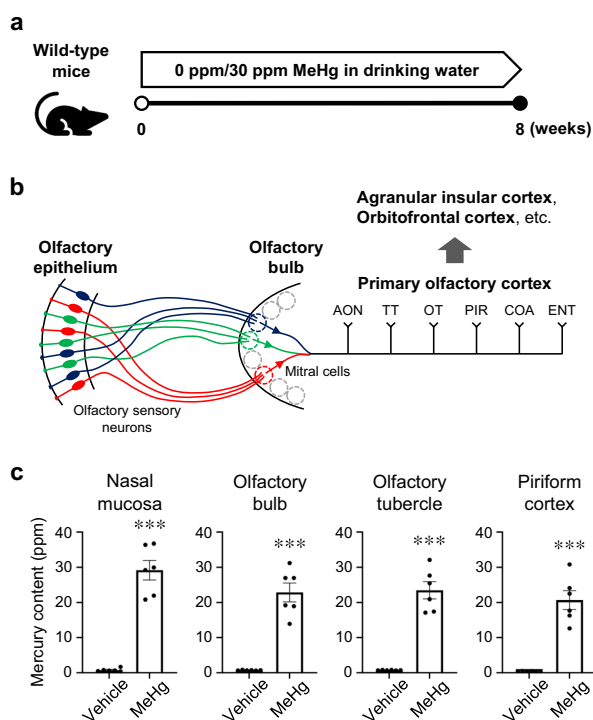


図 1. 嗅覚系伝導路と各部位における水銀量
a: 投与計画, b: 嗅覚伝導路, c: 各部位における水銀蓄積量

2. MeHg の嗅球への作用

嗅球は，表面の嗅神経層，糸球体層，外叢細胞層 (EPI)，分裂細胞層 (Mi)，内叢細胞層 (IPI)，顆粒細胞層 (Gr) の順に続く層構造をしている．神経細胞体は，EPI, Mi, Gr の浅い層である糸球体層に存在する．以前の研究では，30 ppm の MeHg を飲料水経由で 8 週間曝露したマウスの一次運動野で，アポトーシス核が観察された⁷．MeHg が嗅球の神経細胞死を誘発するかどうかを調べるため，まず TUNEL アッセイを用いてアポトーシスを評価した．TUNEL 陽性アポトーシス細胞は，MeHg に曝露したマウスの Gr で有意に増加した(図 2a, b)．嗅球中の水銀含有量が最も高かったマウスでは，Mi でも TUNEL 陽性細胞が認められた(図 2c)．次に，神経細胞マーカーである NeuN の免疫染色を行い，神経細胞の数を評価した．TUNEL アッセイの結果と一致して，NeuN 陽性ニューロンは MeHg 曝露マウスの Gr で有意に減少していた(図 2d, e)．これらの結果は，嗅球顆粒細胞が MeHg 曝露に対して特に脆弱であることを示唆している．

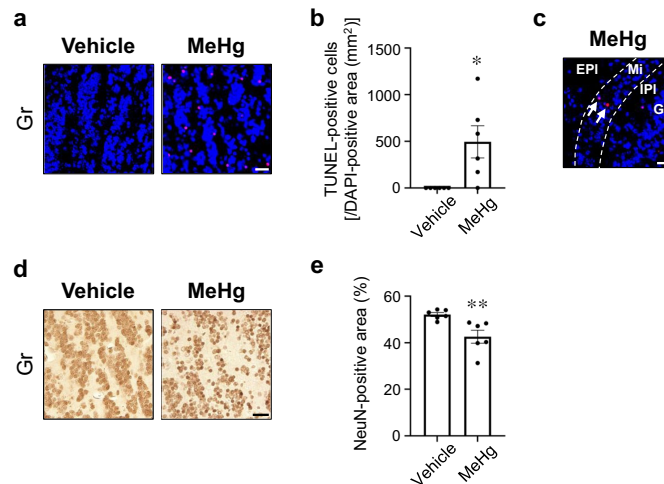


図 2. MeHg による嗅球における神経細胞死

a,b : TUNEL 陽性細胞, c : 水銀蓄積量, d,e : NeuN 陽性細胞

3. MeHg による一次嗅皮質への影響

臨床研究により、水俣病患者は体性感覚皮質、運動皮質、視覚皮質、聴覚皮質において神経細胞消失を示すことが明らかにされている^{8,9}。しかし、嗅覚処理に関与する皮質領域への影響は全く不明である。そこで、MeHg が一次嗅皮質の神経細胞死を誘発するかどうかを調べた。一次嗅皮質は、前嗅核 (AON)、背側蓋紐 (dTT)、腹側蓋紐 (vTT)、嗅結 (OT)、梨状皮質 (PIR)、扁桃皮質 (COA)、嗅内皮質 (IENT) からなるサブ領域である^{10,11}。MeHg 曝露により、IENT を除くすべての小領域で TUNEL 陽性アポトーシス細胞数が増加した。

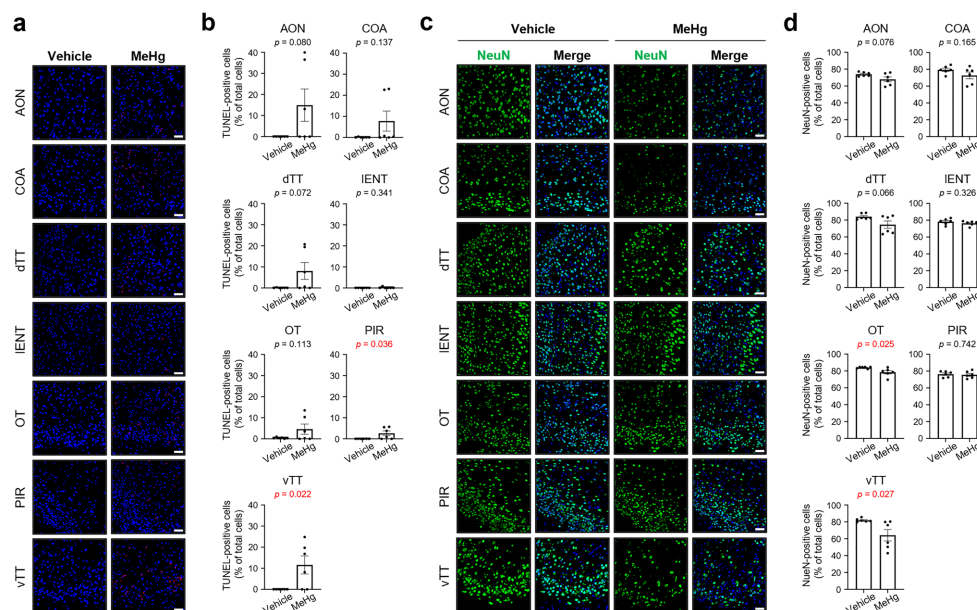


図 3. MeHg による一次嗅皮質における神経細胞死

a,b : TUNEL 陽性細胞, c,d : NeuN 陽性細胞

これらの細胞数の増加は、PIR と vTT で顕著であった (図 3a, b). MeHg に曝露されたマウスでは、PIR と IENT を除くすべてのサブ領域で NeuN 陽性ニューロンの数が減少したが、OT と vTT でのみ有意な減少が見られた (図 3c, d). これらの結果は、MeHg 曝露が嗅覚皮質、特に vTT において神経細胞死を引き起こすことを示している. PIR と OT も有意な変化を示した (それぞれ図 3b と d). しかし、いずれの図でも有意な変化を示した vTT は、他の部位よりも高い変化率を示した.

4. MeHg による二次嗅皮質への影響

一次嗅覚皮質のほとんどのサブ領域は、眼窩前頭皮質 (ORB) や島皮質 (げっ歯類では無頭島皮質) などの高次の二次皮質領域と相互につながっており、感覚統合に関与している^{11,12}. ORB では、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞数が MeHg 曝露によって有意に増加した (図 4a, b). これと一致して、NeuN 陽性ニューロンの数は有意に減少した (図 4c, d). 統計的に有意ではなかったが、無頭島皮質では、MeHg に暴露したマウスの一部で TUNEL 陽性アポトーシス細胞数が増加し、NeuN 陽性ニューロン数が減少する傾向が見られた (図 4a-d).

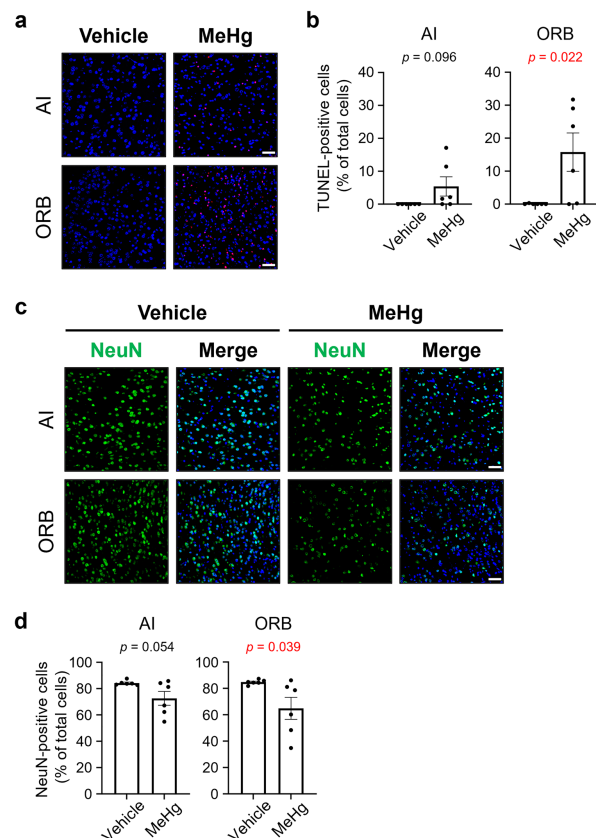


図 4. MeHg による二次嗅皮質における神経細胞死

a,b : TUNEL 陽性細胞, c,d : NeuN 陽性細胞

5. MeHg による ER ストレス惹起に対する 4-PBA の効果

ER ストレスに応答した IRE1 α の活性化は XBP1 mRNA のスプライシングを誘導する. ERAI-VenusTg マウスは、XBP1 と蛍光タンパク質 Venus を融合させることによって構築された^{5,6}. 本系では、XBP1 のスプライシングによるフレームシフトのため、Venus の発現によって ER ストレスが検出できる. 脳における ER ストレスに対する MeHg の影響を調べるため、亜慢性 MeHg 毒性モデルとして ERAI マウスに 50 ppm MeHg を 5 週間まで自由摂取

させた (図 5a) . このモデルにおける神経学的障害への ER ストレスの関与を明らかにするため, 4-PBA (図 5b) をロテノン誘発神経細胞死を抑制するのに十分な用量である 120 mg/kg/day で腹腔内投与した¹³. 5 週間後, GFP 抗体を用いて大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルを免疫組織化学的に検出したところ, MeHg によって誘導された ERAI シグナルは, 4-PBA の同時投与によって有意に減少した (図 5c, d) . さらに, 線条体においても 4-PBA による ERAI シグナルの減少が観察された (図 5e, f) .

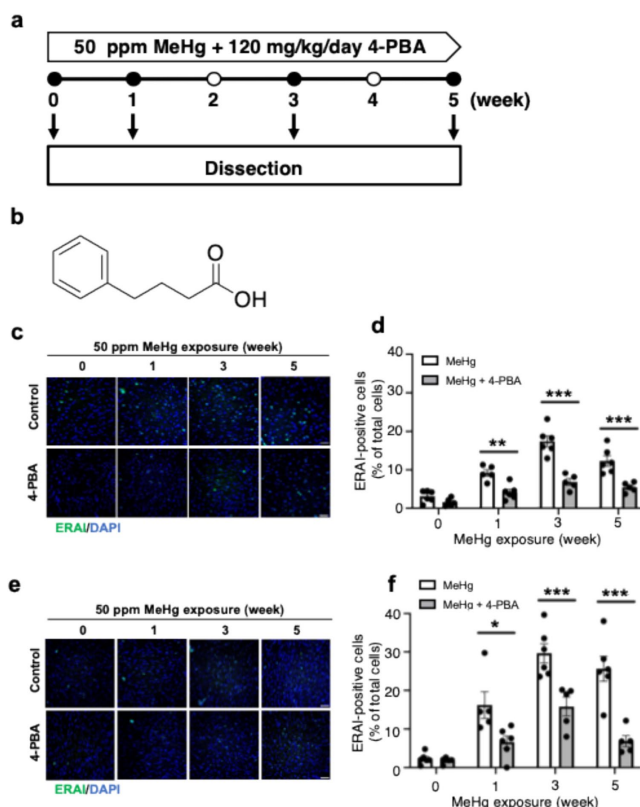


図 5. MeHg による ER ストレス惹起と 4-PBA の作用

a : 投与計画, b : 4-PBA の構造, c, d : 大脳皮質における MeHg による小胞体ストレス惹起に対する 4-PBA の効果 : e, f : 線条体における 4-PBA の効果

6. MeHg による ER ストレス応答 (UPR) 活性化に対する 4-PBA 抑制作用

次に, ER ストレスを感知すると自己リン酸化によって活性化される ER ストレスセンサータンパク質である IRE1 α に対する 4-PBA の影響を解析した. MeHg 投与は, 体性感覚皮質において時間依存的に IRE1 α のリン酸化を促進した (図 6a, b) . IRE1 α の活性化は 4-PBA 処理によって抑制された (図 6a, b) . 線条体における MeHg 誘導性のリン酸化は, 3 週間の曝露後にピークに達したが, 4-PBA 処理によって抑制された (図 6c, d) . IRE1 α による XBP1 mRNA スプライシングの活性化を調べるために, HMG-CoA 還元酵素 1 (HRD1) のレベルを解析した. HRD1 は E3 ユビキチンリガーゼであり, XBP1 のスプライシングによって生

じる XBP1 ホモダイマーによって転写が誘導される. MeHg によって誘導された HRD1 レベルは, 大脳皮質体性感覚領域と線条体領域の両方で解析され, MeHg 処理開始から 3 週間後にピークに達した (図 6e-h). さらに, HRD1 の発現は 4-PBA 処理によって両領域で減少した (図 6e-h).

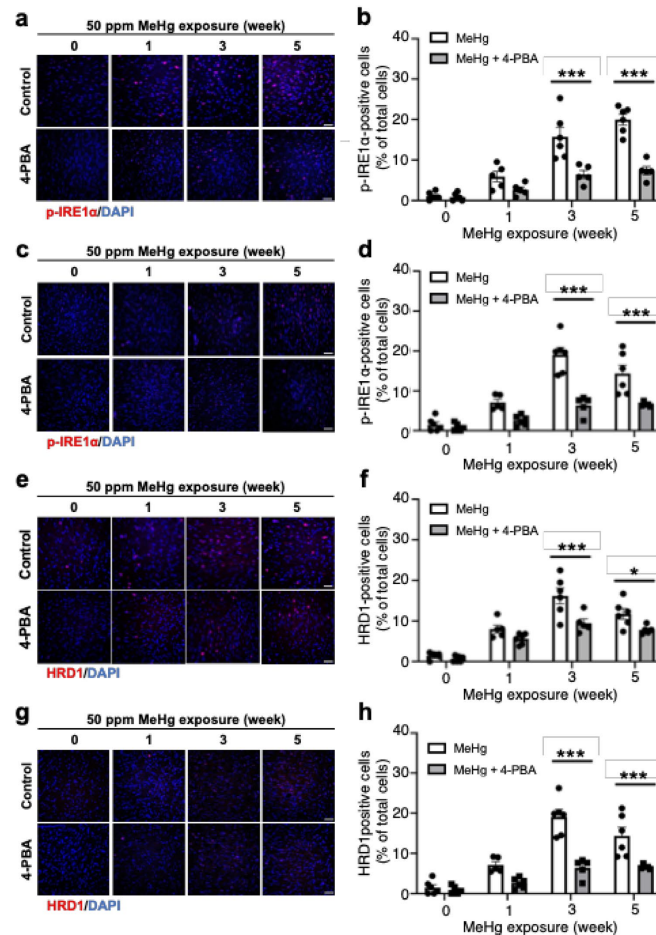


図 6. MeHg による ER ストレス応答に対すると 4-PBA の抑制作用

a,b : 大脳皮質体性感覚野におけるリン酸化 IRE1αに対する作用, c,d : 線条体におけるリン酸化 IRE1αに対する作用, e,f : 大脳皮質体性感覚野における HRD1 誘導, g,h : 線条体における HRD1 誘導

7. 4-PBA の ER ストレス誘発性 PERK 活性化への影響

次に, UPR におけるアポトーシス誘導に関与する PERK 経路の活性を調べた. PERK は ER ストレスを感知すると自己リン酸化により活性化され, アポトーシス誘導に関連する転写因子 CHOP の発現を誘導する. MeHg 曝露は PERK のリン酸化を促進したが, これは 4-PBA によって抑制された. 4-PBA は線条体における MeHg 誘発 PERK リン酸化も抑制した. 続いて, 体性感覚野と線条体における CHOP レベルの時間変化を解析した結果, MeHg 曝露に伴う両領域の CHOP レベルの時間依存的上昇は, 4-PBA によって抑制された.

8. 4-PBA の MeHg 誘発性神経細胞死に対する抑制作用

4-PBA はアポトーシス誘導に関与する PERK 経路の活性化を阻害することから、4-PBA はアポトーシスを抑制することが示唆された。そこで、アポトーシスのマーカーである TUNEL アッセイにおける TUNEL 陽性細胞数を解析することで、MeHg による神経細胞アポトーシスに対する 4-PBA の効果を検討した。4-PBA は、体性感覚野 (図 7a, b) と線条体 (図 7c, d) における TUNEL 陽性細胞数の増加を有意に抑制した。

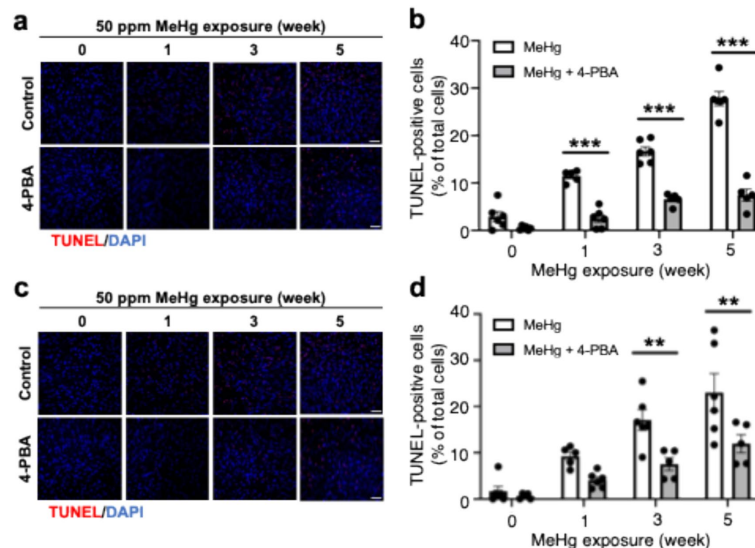


図 7. MeHg による神経細胞死に対する 4-PBA 抑制作用

a, b: 大脳皮質体性感覚野における TUNEL 陽性細胞, c, d: 線条体における TUNEL 陽性細胞

9. 4-PBA の MeHg 誘発性神経症状に対する抑制作用

4-PBA が MeHg 誘発細胞死を抑制したことから、4-PBA が MeHg 曝露による神経症状を緩和できるかどうかを検討した。MeHg 中毒モデルで神経学的症状を分析する方法として一般的に用いられている後肢伸展のスコアを分析した¹⁴。スコアリングは、先行研究と同様に 4 段階で分析した^{15,16}。4-PBA は、投与 5 週目以降、MeHg による後肢伸展障害を有意に回復させた (図 8a, b)。これらの結果は、4-PBA が MeHg 誘導性神経細胞障害を抑制すること、そして 4-PBA が標的とする ER ストレスの誘導と UPR 活性の変化が、MeHg 誘導性神経細胞死のメカニズムにおいて重要であることを示している。

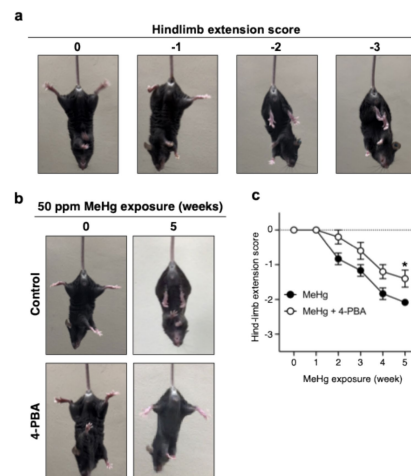


図 8. 4-PBA の MeHg 誘発性神経症状に対する効果 a: MeHg による後肢伸展障害, b, c: 4-PBA による後肢伸展障害回復効果

10. 4-PBA の有効治療効果時期の検討

次に, MeHg 毒性による障害の経時的進行を調べた. 不可逆的な障害が発生するカットオフポイントと, MeHg 曝露から 4-PBA 治療開始までの有効な時間幅を検討した. また, MeHg 曝露開始から 4-PBA 投与開始までに間隔がある場合でも, 4-PBA が MeHg 毒性を抑制できるかどうかを評価した. 先行研究に基づき⁷, WT マウスを 30ppm MeHg に曝露した (図 9a). 神経学的症状と脳内の TUNEL 陽性細胞数を分析した. 4-PBA の後処理は, 処理後 1 週間の群では一時的な体重減少を引き起こしたが, 全体的な体重減少には影響しなかった. 後肢伸展測定から, MeHg 曝露開始 2 週間後に 4-PBA を投与した場合にも, 神経症状の抑制が観察された (図 9b-d). 体性感覚野と線条体における神経細胞死を評価するために TUNEL 染色を行った. 後肢伸展反応の結果と一致し, MeHg 曝露開始後 2 週間までは神経細胞死が抑制される傾向が観察された. これらの結果から, 30 ppm の MeHg 中毒から神経変性に至る不可逆的損傷のカットオフポイントは 2 週間であることが示唆される.

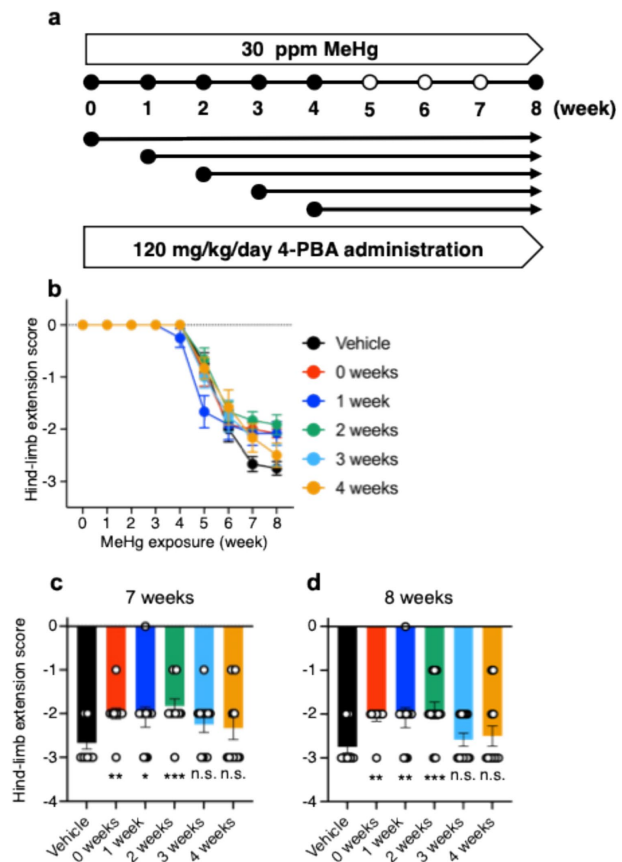


図 9. MeHg 誘発性神経症状に対する 4-PBA の治療可能時間域

a: 投与計画の詳細, b: 各 4-PBA 処理時間における後肢伸展障害回復効果, c,d: MeHg 7-8 週間投与後における 4-PBA の回復効果

IV 考察

MeHg による嗅覚伝導路に対する影響について

本研究では, 飲料水による MeHg 中毒モデルを確立し, 水銀が嗅覚系に広く蓄積することを見出した (図 1). 嗅球の顆粒細胞層は MeHg 曝露に対して特に脆弱であり (図 2), 嗅覚処理に関与する皮質領域で神経細胞死が起こる (図 3 および 4). これらのデータは, MeHg の脳内分布に対する化学的特性から, MeHg が嗅覚系に対して比類ない毒性を持つことを示している. さらに, MeHg 中毒マウスの鼻粘膜には水銀が蓄積し, 嗅覚上皮は部分的に萎縮していた. この研究は, 環境化学物質の経口曝露が嗅覚も障害する可能性を示唆しており,

MeHgに類似した性質を持つ化学物質の毒性解析のモデルとして役立つ可能性がある。

水俣病では視覚と聴覚の中樞感覚障害を引き起こす^{17,18}。しかし、嗅覚に関与する皮質領域の病態生理は不明なままである。本研究では、MeHg曝露マウスの嗅覚皮質で神経細胞死が起こった(図3および4)。vTTとORBはMeHgに対して特に脆弱であり、神経細胞喪失の程度は血漿水銀濃度に強く反映された(図4)。嗅覚皮質の各部位における神経細胞喪失の程度に差をもたらした具体的な要因はまだ不明であるが、今回の結果は、中枢神経系の損傷がMD患者の嗅覚障害に寄与していることを示唆している。水俣病患者は、低嗅覚症や嗅覚障害などの嗅覚障害を呈する¹⁹。低嗅覚症は量的な機能障害であり、匂いを嗅ぎ分ける能力が低下する。低嗅覚症はアルツハイマー病やパーキンソン病の患者にもみられ、中枢神経障害によって引き起こされることもある²⁰。アルツハイマー病患者の脳組織やアルツハイマー病モデルマウスの脳組織では、嗅球系の病理学的変化や神経細胞機能障害が示されており^{21,22}、海馬との位置的・機能的な関係は強固である。しかし、本研究では、MeHg中毒マウスの嗅球系では、神経細胞の減少やグリアの活性化といった病理学的変化は起こらなかった(図3)。さらに、海馬のニューロンは大脳皮質のニューロンよりもMeHgに対する抵抗性が強い²³。このように、アルツハイマー病とMDはともに脳障害による嗅覚機能障害を引き起こすが、脳病変には明確な違いがあることがわかる。

嗅覚障害は、「自然な」においを正しく識別できないことを特徴とする質的機能障害である。嗅覚障害の基礎となる病理メカニズムについては議論があるが、いくつかの仮説が提唱されている。OSNの部分的喪失、インターニューロンの喪失による嗅球の機能障害、嗅覚統合／解釈に関与する中枢神経系の病理、再生OSNの軸索タル形成異常を含む損傷後の嗅覚地図の変化などである^{24,25}。これらの仮説と一致するように、本研究では、MeHgが嗅上皮を少なくとも部分的に破壊し(図6)、顆粒細胞を傷害し(図2)、嗅皮質および高次皮質領域で神経細胞死を引き起こすことが明らかになった(図3および4)。したがって、これらの複数の障害が、MD患者における感覚障害の病因に関与している可能性がある。

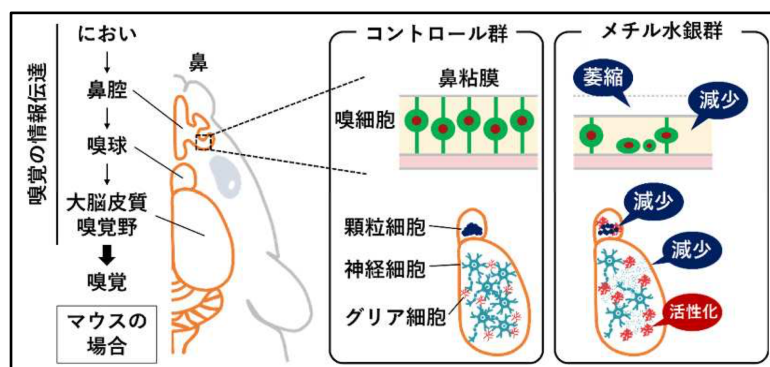


図10: メチル水銀の嗅覚系への作用

本研究はMeHg中毒における嗅覚機能障害の病態を解明するために行われた。その結果、MeHgは外因性化学物質に対して脆弱な嗅上皮や嗅球だけでなく、嗅皮質のような高次脳領域も傷害することがわかった。これらの結果は、MeHg中毒が嗅覚機能障害を引き起こすと

いうさらなる証拠を提供するとともに、環境化学物質が嗅覚系にどのような障害を与えるかについて新たな知見を与えるものである。

MeHg 誘発性神経細胞死・神経症状に対する 4-PBA の治療効果について

ER ストレスを時空間的に解析できる ERAI-Venus Tg マウスを用いて、MeHg による神経細胞死が観察された体性感覚野と線条体における ER ストレスを解析した。その結果、4-PBA は MeHg による ERAI 陽性細胞数の増加を有意に抑制した (図 5)。一方、4-PBA は脳内の水銀蓄積や体重には影響を与えなかった。さらに、MeHg による IRE1 α -XBP1 経路 (図 6) および PERK 経路の活性化も、4-PBA によって抑制された。さらに、TUNEL 染色を用いて、MeHg による神経細胞死に対する 4-PBA の効果を調べたところ、4-PBA は MeHg による TUNEL 陽性細胞数の増加を抑制した (図 7)。また重要なことに、4-PBA は MeHg による神経障害を示す後肢伸展スコアの低下も抑制した (図 8)。これらの結果は、MeHg 毒性に対する 4-PBA の予防効果を示している。しかし、MeHg 毒性は進行性の神経変性を引き起こす可能性があり、この病態の早期治療が重要である。そこでわれわれは、不可逆的な損傷が発生する時点を分析した。その結果、30ppm の MeHg 曝露開始から 2 週間後に 4-PBA を開始した場合でも、4-PBA は神経障害を軽減する効果があることがわかった (図 9)。これらの結果は、小胞体ストレスの抑制が、30 ppm MeHg 曝露の初期段階における MeHg 毒性に対する治療戦略の可能性を示している。

今回の発見は、4-PBA の標的である ER ストレスと UPR が、MeHg 毒性の発現に中心的に関与するシグナルであることを示している。しかし、MeHg による神経細胞死を直接誘導する特定の因子は依然として不明であり、UPR の各因子を調節する方法を用いて、MeHg による神経細胞死を *in vivo* で緩和できるかどうかを実証する研究が必要である。CHOP-KO マウスを用いた我々の解析では、CHOP は MeHg 誘導性神経細胞死には関与しないことが示唆されている。MeHg 毒性における PERK 経路の関与については、PERK 阻害薬を用いてさらなる解析を行う必要がある。IRE1 α によって媒介される ASK1/JNK 経路は、ER ストレスによって媒介される CHOP 非依存性のアポトーシス経路である。MeHg は ASK1/JNK 経路を活性化し^{26,27}、この経路の作用が、本研究で 4-PBA が MeHg による細胞死を抑制した理由のひとつであると考えられる。加えて、ATF6 経路の活性化阻害に対する MeHg 毒性への影響については検討していない。MeHg による神経細胞死には、ER ストレス以外のメカニズムが関与していることが調べられてきた。したがって、30 ppm の MeHg に曝露された最初の 2 週間は、ER ストレスが毒性の主なメカニズムであるが (図 6)、ミクログリアの活性化など、他の細胞死メカニズムが誘導されることによって、細胞死が加速される可能性がある。

V 結論

1. マウスへのメチル水銀投与によって、嗅球の中でも特に嗅球顆粒細胞における神経細胞死が顕著であった。
2. メチル水銀投与によって、一次嗅皮質中、前嗅核 (AON)、背側蓋紐 (dTT)、腹側蓋紐 (vTT)、嗅結 (OT)、梨状皮質 (PIR)、扁桃体皮質 (COA) において TUNEL 陽性細胞数の有意な増加を認めた。
3. 二次嗅皮質中、眼窩前頭皮質 (ORB) においてメチル水銀誘導性の神経細胞死が観察された。
4. 以上より、メチル水銀投与マウスにおいて、嗅覚伝導路である嗅球→一次嗅皮質→二次嗅皮質において神経細胞死が認められ、嗅覚異常との関係性が示唆された。
5. 小胞体ストレス抑制効果を有するケミカルシャペロン 4-PBA はメチル水銀投与による小胞体ストレス惹起・UPR 活性化と神経細胞死・神経症状に対して抑制効果を示した。
6. 4-PBA はメチル水銀曝露後、2 週目までの投与でも有効であることを示した。これまで、メチル水銀後から投与によっても有効な薬物の報告は無く、本知見はメチル水銀の初期的な曝露に 4-PBA が有効であることを示す知見である。

VI 今後の課題

本研究ではマウス脳における新規メチル水銀誘導性神経細胞死部位の同定と 4-PBA の治療可能時間域について明らかにしたが、今後解決しなければならない課題があり、次年度以降に解析する予定である。

1) 嗅覚伝導路における神経細胞死に対する ER ストレスの関与

マウスへのメチル水銀投与によって、嗅球の中でも特に嗅球顆粒細胞、一次嗅皮質 (前嗅核 (AON)、背側蓋紐 (dTT)、腹側蓋紐 (vTT)、嗅結 (OT)、梨状皮質 (PIR)、扁桃体皮質 (COA))、二次嗅皮質 (眼窩前頭皮質 (ORB)) において、神経細胞死が観察された。これらの細胞死が ER ストレスを介しているのか否か、ERAI-Venus Tg マウスを用いて解析する。また、ER ストレスを介することが示唆された場合、4-PBA の効果の有無についても検証する。

2) メチル水銀誘発性神経細胞死惹起機構の詳細

小胞体ストレス応答により、少なくとも 3 種の転写因子が活性化することが報告されている。従って、メチル水銀による小胞体ストレス応答を介した神経細胞死には何らかの誘導遺伝子産物が関与している可能性が推定された。そこで、小胞体ストレス誘発性細胞死が認められた大脳皮質体性感覚野や線条体などにおける mRNA を経次的に調製し、RNA-seq を実施する。どのような遺伝子が誘導あるいは減弱するのか、gene ontology 解析や gene set enrichment analysis を行い、その結果を踏まえて、神経細胞死機構に迫る予定である。

3) メチル水銀曝露によって惹起される神経細胞死誘導部位の探索

メチル水銀曝露によって脳内で観察される TUNEL 陽性部位を調べた結果、嗅球や嗅覚伝

導路を新たに同定することに成功した。このことは、これまでに神経細胞死が観察されてきた大脳皮質や線条体など以外にも、新規障害部位が存在することを示唆するものである。事実、申請者は既に未同定の領域を複数明らかにすることに成功している（未発表データ）。そこで、それらの部位、回路、役割を明らかにする必要がある。加えて、水俣病患者の臨床症状との相関を調べ、次に何を解析すべきか（優先性）の指標とする。

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, 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.
- 2) Iijima Y, Miki R, Takasugi N, Fujimura M, Uehara T.* Characterization of pathological changes in the olfactory system of mice exposed to methylmercury. *Arch Toxicol.* 2024 Apr;98(4):1163-1175. doi: 10.1007/s00204-024-03682-w. Epub 2024 Feb 17.
- 3) Miki R, Nomura R, Iijima Y, Kubota S, Takasugi N, Iwawaki T, Fujimura M, Uehara T.* Therapeutic potential of 4-phenylbutyric acid against methylmercury-induced neuronal cell death in mice. *Arch Toxicol.* 2025 Feb;99(2):563-574. doi: 10.1007/s00204-024-03902-3. Epub 2024 Oct 27.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 5) Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. & Miura, M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 10, 98–102 (2004).
- 6) Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S. & Kohno, K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential

for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16657–16662 (2009).

7) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Takashima A (2009) Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology* 30(6):1000–1007.

8) Eto K, Takeuchi T (1978) A pathological study of prolonged cases of Minamata disease. With particular reference to 83 autopsy cases. *Acta Pathol Jpn* 28(4):565–584.

9) Takeuchi T, Morikawa N, Matsumoto H, Shiraishi Y (1962) A pathological study of Minamata disease in Japan. *Acta Neuropathol* 2(1):40–57.

10) Schröder H, Moser N, Huggenberger S (2020) The Mouse Olfactory System Neuroanatomy of the Mouse. 319–331

11) Wilson DA, Xu W, Sadrian B, Courtiol E, Cohen Y, Barnes DC (2014) Cortical odor processing in health and disease. *Prog Brain Res* 208:275–305

12) Mizoguchi N, Muramoto K, Kobayashi M (2020) Olfactory signals from the main olfactory bulb converge with taste information from the chorda tympani nerve in the agranular insular cortex of rats. *Pflugers Arch* 472(6):721–732.

13) Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H et al (2007) Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem* 101(6):1491–1504

14) Weiss B, Stern S, Cox C, Balys M (2005) Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: behavioral effects. *Neurotoxicology* 26(4):675–690.

15) Chakrabarti SK, Bai C (2000) Effects of protein-deficient nutrition during rat pregnancy and development on developmental hindlimb crossing due to methylmercury intoxication. *Arch Toxicol* 74(4–5):196–202.

16) Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S (2011) Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 250(1):1–9.

17) Eto K (1997) Pathology of Minamata disease. *Toxicol Pathol* 25(6):614–623

18) Harada M (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25(1):1–24.

19) Furuta S, Nishimoto K, Egawa M, Ohyama M, Moriyama H (1994) Olfactory dysfunction in patients with Minamata disease. *Am J Rhinol* 8(5):259–264.

20) Ubeda-Bañon I, Saiz-Sanchez D, Flores-Cuadrado A et al (2020) The human olfactory system in two proteinopathies: Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Translat Neurodegener* 9(1):22.

21) Igarashi KM (2023) Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*

46(2):124–136

- 22) Khan UA, Liu L, Provenzano FA et al (2014) Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 17(2):304–311.
- 23) Fujimura M, Unoki T (2022) Preliminary evaluation of the mechanism underlying vulnerability/resistance to methylmercury toxicity by comparative gene expression profiling of rat primary cultured cerebrocortical and hippocampal neurons. *J Toxicol Sci* 47(5):211–219.
- 24) Altundag A (2023) Parosmia and phantosmia: managing quality disorders. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 11(1):19–26
- 25) Ciurleo R, De Salvo S, Bonanno L, Marino S, Bramanti P, Caminiti F (2020) Parosmia and neurological disorders: a neglected association. *Front Neurol* 11:543275.
- 26) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Takashima A (2009) Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology* 30(6):1000–1007.
- 27) Usuki F, Fujita E, Sasagawa N (2008) Methylmercury activates ASK1/ JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *Neurotoxicology* 29(1):22–30.

英文要約 (Abstract)

Methylmercury (MeHg) is an environmental neurotoxicant that results in severe brain disorders such as Minamata disease. Although some patients with Minamata disease develop olfactory dysfunction, the underlying patho-mechanism is still unclear. In this study, we, therefore, investigated the effect of MeHg on the olfactory system *in vivo*. Mice exposed to MeHg displayed significant Hg accumulation in the olfactory pathway, including the nasal mucosa, olfactory bulb, and olfactory cortex. The olfactory epithelium was partially atrophied and olfactory sensory neurons were moderated. The olfactory bulb displayed an increase in apoptotic cells, hypertrophic astrocytes, and amoeboid microglia, mainly in the granular cell layer. Neuronal cell death has been observed in the olfactory cortex, particularly in the ventral tenia tecta. Neuronal cell death was also remarkable in higher-order areas such as the orbitofrontal cortex. Correlation analysis exhibited that neuronal loss in the olfactory cortex was strongly correlated with the plasma mercury concentration. Our results indicate that MeHg is an olfactory toxicant that damages the central regions involved in odor perception. The model described here is useful for analyzing the mechanisms and treatment of olfactory dysfunction in MeHg-intoxicated patients.

Subsequently, we studied whether intraperitoneal administration of the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid (4-PBA) at 120 mg/kg/day could improve neurotoxicity in the brains of mice

administered 50 ppm MeHg in drinking water for 5 weeks. 4-PBA significantly reduced MeHg-induced ER stress, neuronal apoptosis, and neurological symptoms. Using ERAI-Venus Tg mice, in which ER stress can be analyzed spatiotemporally, we analyzed ER stress in the somatosensory cortex and striatum, where MeHg-induced neuronal cell death was observed. 4-PBA significantly suppressed MeHg-induced increases in the number of ERAI-positive cells. MeHg activation of the IRE1 α -XBP1 and PERK pathways was also inhibited by 4-PBA. Furthermore, 4-PBA was effective even when administered two weeks after the initiation of exposure to 30 ppm MeHg in drinking water. These results strongly indicate that ER stress and the UPR are key processes involved in MeHg toxicity and that 4-PBA is a novel therapeutic candidate for MeHg-induced neurotoxicity.