

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、メチル水銀 (MeHg) 曝露がマウス脳において神経特異的に小胞体 (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。

さらに、ER ストレスを介した神経細胞死に関わる分子基盤を明らかにするため、UPR の下流に位置するアポトーシス誘導因子である CHOP の影響を検討した。しかしながら、MeHg 投与した CHOP KO マウスでは、有意な神経細胞死抑制効果は認められなかった。そこで、ER ストレス依存性の遺伝子発現を明らかにするために、MeHg 処理したマウス脳組織 (大脳皮質体性感覚野) を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、グリア細胞由来と推定される炎症・免疫応答遺伝子の顕著な上昇が認められたものの、ER ストレス関連遺伝子の上昇は認められなかった。

また、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実施・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、陽性細胞の有無を全領域に渡って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。

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。さらに、MeHg 誘発性神経細胞死の分子メカニズム、特に ER ストレスの関与を明らかにするために、代表的な障害部位である大脳皮質体性感覚野を対象とした RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。

II 材料と方法

1. 材料

C57BL/6NJcl 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: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⁵⁶。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。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。

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。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。雄性 CHOPKO マウスと雌性 CHOPKO 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。

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. 後肢伸長反射の観察

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）。



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°C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。回転式マイクロトーム（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 \times 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 \times 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 \times 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 \times 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、水を満たしたドレ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。

6. 免疫蛍光染色

蛍光組織染色と同条件で前処理した切片を対象に免疫蛍光染色を行った。抗原賦活化として 10 mM Citrate buffer pH 6 (Genemed Biotechnologies) に浸漬し、電子レンジ (Hitachi) 600 W で 20 分間加熱した。室温で 30 分以上冷却後、滅菌精製水で洗浄した。続いて、PBS により 3 v/v% に調製した Normal Goat Serum (Vector Laboratories) 200 μ L を添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。

一次抗体は、PBS で 1 v/v% Normal Goat Serum となるよう調製した希釈液により所定濃度へ調整し、200 μ L を添加して室温で 1 時間反応させた。PBS 中で 10 分間 \times 2 回洗浄後、PBS で適切濃度に希釈した二次抗体 200 μ L を添加し、遮光下室温で 1 時間反応させた。

PBS で 10 分間 \times 3 回洗浄後、DAPI を含む封入剤 VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting with DAPI (Vector Laboratories,) を、脳切片に 40 μ L 添加し、カバーガラス (Matsunami Glass) で封入した。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. 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 μ 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 μ 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 \times 2 回洗浄し、水気を切ったあとに TUNEL 反応液 20 μ 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 \times 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 μ 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。

8. RNA 抽出

MeHg 含有飲水を投与したマウスを解剖し、速やかに脳を摘出した。摘出した脳は氷冷下で 1 mm 幅の冠状切片として切り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質体性感覚野を摘出した。得られた脳組織から RNeasy キットを用いて総 RNA を抽出した。得られた RNA サンプルは、株式会社日本ジェネティクスに RNA-seq 解析を委託した。

9. 遺伝子発現解析

RNA-seq により得られたシーケンスデータは、FastQC を用いて品質評価を行った後、Trimomatic によりアダプター配列および低品質リードのトリミングを行った。トリミング後のリードは Salmon を用いて参照トランスクリプトームにマッピングし、トランスクリプトごとの TPM (transcripts per million) 値を算出した。算出した TPM データを用いて、統計解析ソフト R および RStudio 上で主成分分析 (principal component analysis : PCA) および Gene Ontology (GO) 解析を実施した。クラスタリング解析は iDEP を用いて行い、ボルケーノプロットは GraphPad Prism を用いて作成した。

10. 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 (承認番号 : 041116 および 050315-1, 承認番号 : 050912 および 051221) で承認を受けた。

III 研究結果

1. 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 1a)。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 1b) 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 1c,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 1e,f)。

図 1. 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

2. 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 2a,b)。IRE1 α の活性化は 4-PBA 処理によって抑制された (図 2a,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 2c,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 2e-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 2e-h)

図 2. MeHg による ER ストレス応答に対する 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 IRE1 α に対する作用, c, d : 線条体におけるリン酸化 IRE1 α に対する作用, e, f : 大脳皮質体性感覚野における HRD1 誘導に対する作用, g, h : 線条体における HRD1 誘導に対する作用

3. 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.

4. 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 3a, b) と線条体 (図 3c, d) における TUNEL 陽性細胞数の増加を有意に抑制した。

図 3. 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 陽性細胞に対する作用,
c, d : 線条体における TUNEL 陽性細胞に対する作用

5. 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⁸。スコアリングは、先行研究と同様に 4 段階で分析した (図 4a)^{9,10}。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 4b, c)。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4. 4-PBAのMeHg誘発性神経症状に対する効果
a: 後肢伸展反射の評価, b, c: 4-PBAによる後肢伸展障害回復効果

6. 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（Window of opportunity Study）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¹¹、WTマウスを30 ppm MeHgに曝露した（図5a）。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。MeHgによる中枢神経障害の臨床指標として後肢伸展反射を用い、4-PBA後処理の神経症状に対する効果を評価した（図5b-j）。MeHg+Vehicle群では、曝露開始後の経過に伴い後肢伸展スコアの悪化が進行し、MeHg曝露4週目以降で顕著な伸展障害が認められた（図5b）。これに対し、MeHg曝露開始から1週後に4-PBA投与を開始した群では、後肢伸展スコアの悪化が有意に抑制され、曝露終期においてもMeHg単独群と比較してスコアが維持されていた（図5c）。さらに、MeHg曝露開始から2週後に4-PBA投与を開始した群においても、後肢伸展スコアの悪化は一定程度抑制され、MeHg単独群と比較して有意な抑制が認められた（図5d）。一方、曝露開始から3週目以降に4-PBA投与を開始した群では、後肢伸展障害の進行に対する改善効果は認められなかった（図5e, f）。また、4-PBAの効果はMeHg投与後7週目から顕著であった（図5g-j）。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（データ未提示）。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5. 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-f: 各4-PBA処理時間における後肢伸展障害回復効果,
g-j: MeHg 5-8週間投与後における4-PBAの回復効果

7. CHOP KO 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/6NJcl 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6)。



図6. 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 30 ppm 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, $n = 11$)。

8. 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 6 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 7), 血中水銀含量は先行研究 (14.0 ± 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 7)。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。

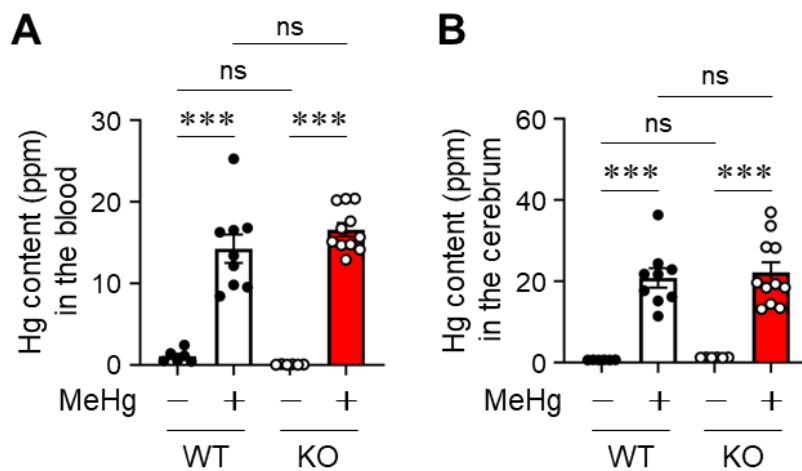


図 7. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響
A: 血液中総水銀量, B: 大脳皮質中総水銀量

9. 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 8A), 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 8A)。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 8B)。

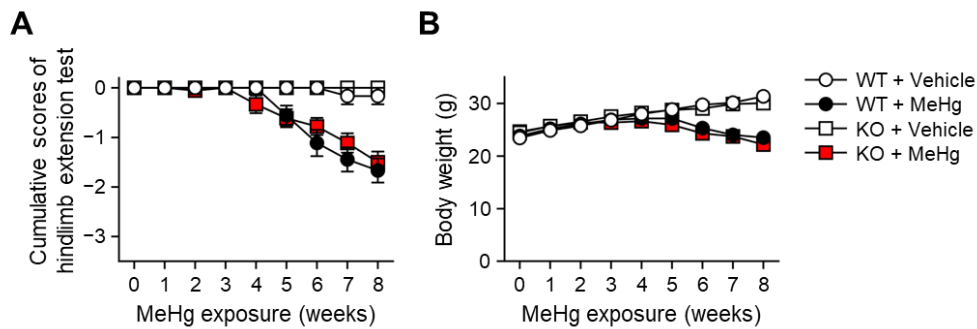


図8. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響
A: 後肢伸展反射スコアの推移, B: 体重の推移

10. 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 染色によって大腦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腦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 9A,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腦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的大脑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 9C,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。

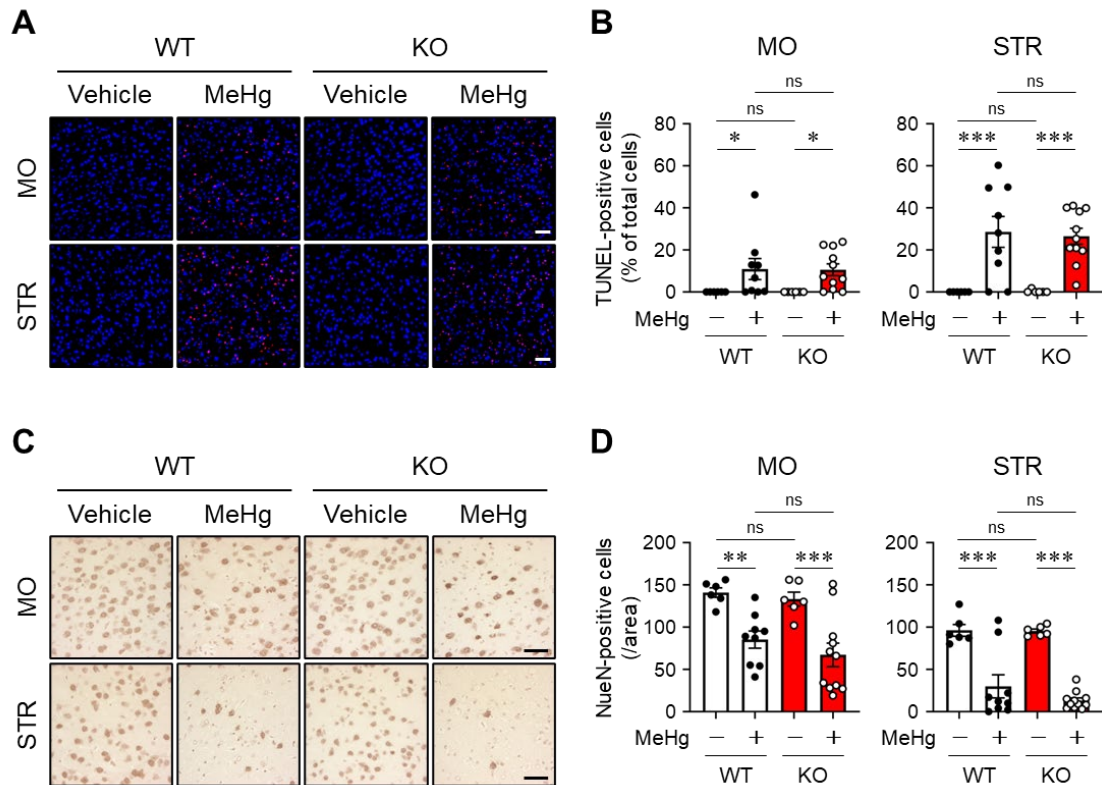


図9. MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響
 A: TUNEL 染色像, B: TUNEL 陽性細胞の定量図,
 C: NeuN 免疫組織染色像, D: NeuN 陽性細胞の定量図

11. MeHg 曝露に伴う脳障害部位における遺伝子発現変化

これまでの検討から、小胞体ストレスが MeHg 誘導性の神経細胞死に関与することが示唆されてきたが、小胞体ストレスの下流でどのような遺伝子群が変動し、神経変性過程に寄与しているのかは十分には明らかでない。そこで本検討では、MeHg 毒性の代表的な標的部位である大脳皮質体性感覚野に着目し、MeHg 曝露に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq により網羅的に解析した。先行研究に基づき、WT マウスに 30 ppm MeHg を自由飲水により投与した。神経変性の初期および進行期に相当する曝露 4 週および 7 週時点で体性感覚野を摘出して RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。主成分解析およびクラスタリング解析の結果、7 週処理群はコントロール群および 4 週処理群と明瞭に分離し、曝露後期において顕著な遺伝子発現プロファイルの変化が生じていることが示された (図 10a,b)。ボルケーノプロットの結果からも、7 週処理群において多数の遺伝子が有意に変動しており、とくに 4 週処理群との比較で大きな発現変化が認められた。一方で、小胞体ストレス応答および UPR 関連遺伝子群に着目すると、多くの遺伝子は統計的に有意

な発現上昇を示さず、遺伝子群全体としての一貫したアップレギュレーションは認められなかった (図 10c) .

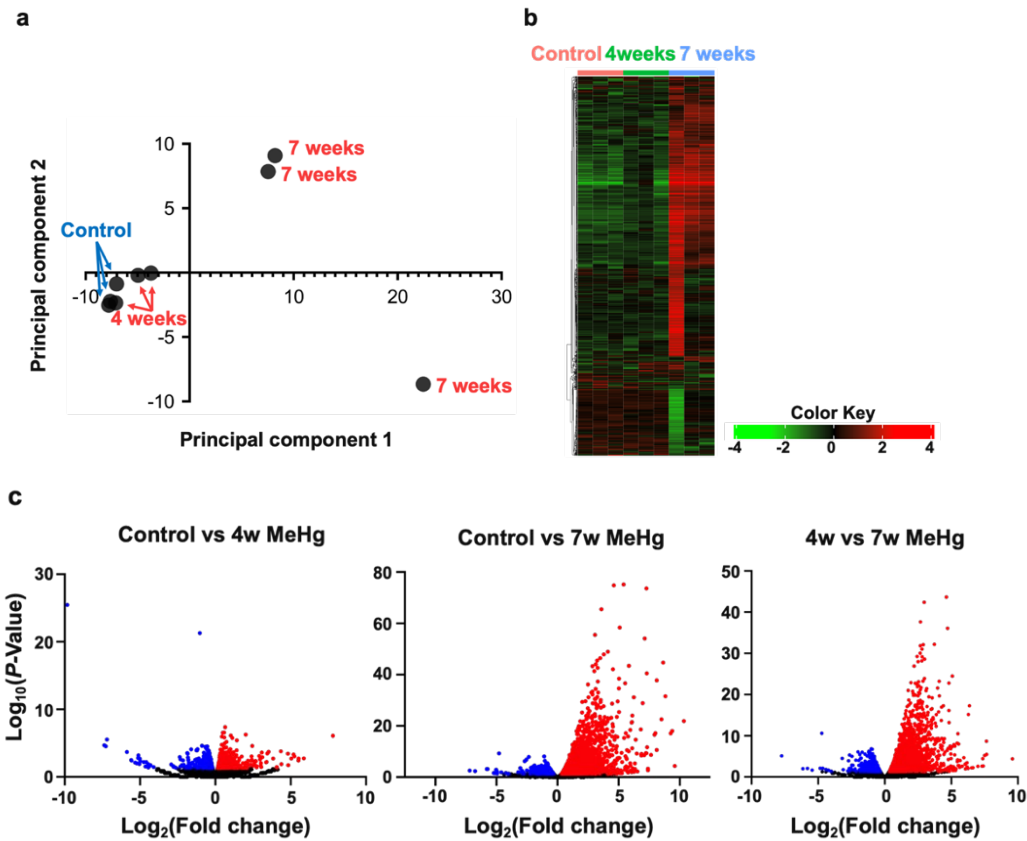


図 10. MeHg による遺伝子発現の変化

a : コントロール群/MeHg 4 週処理/MeHg 7 週処理群の主成分分析, b : クラスタリング解析, c : ボルケーノプロット

次に、差次的に発現変動した遺伝子群を対象として GO (Gene Ontology) 解析を行った。コントロール群と 4 週処理群, コントロール群と 7 週処理群, さらに 4 週処理群と 7 週処理群のいずれの比較においても、ウイルス応答, インフラマソーム関連, インターフェロニングナルなど, 主としてグリア細胞由来であることが予想される免疫応答関連の GO タームが一貫してアップレギュレートされていた (図 11a-c) .

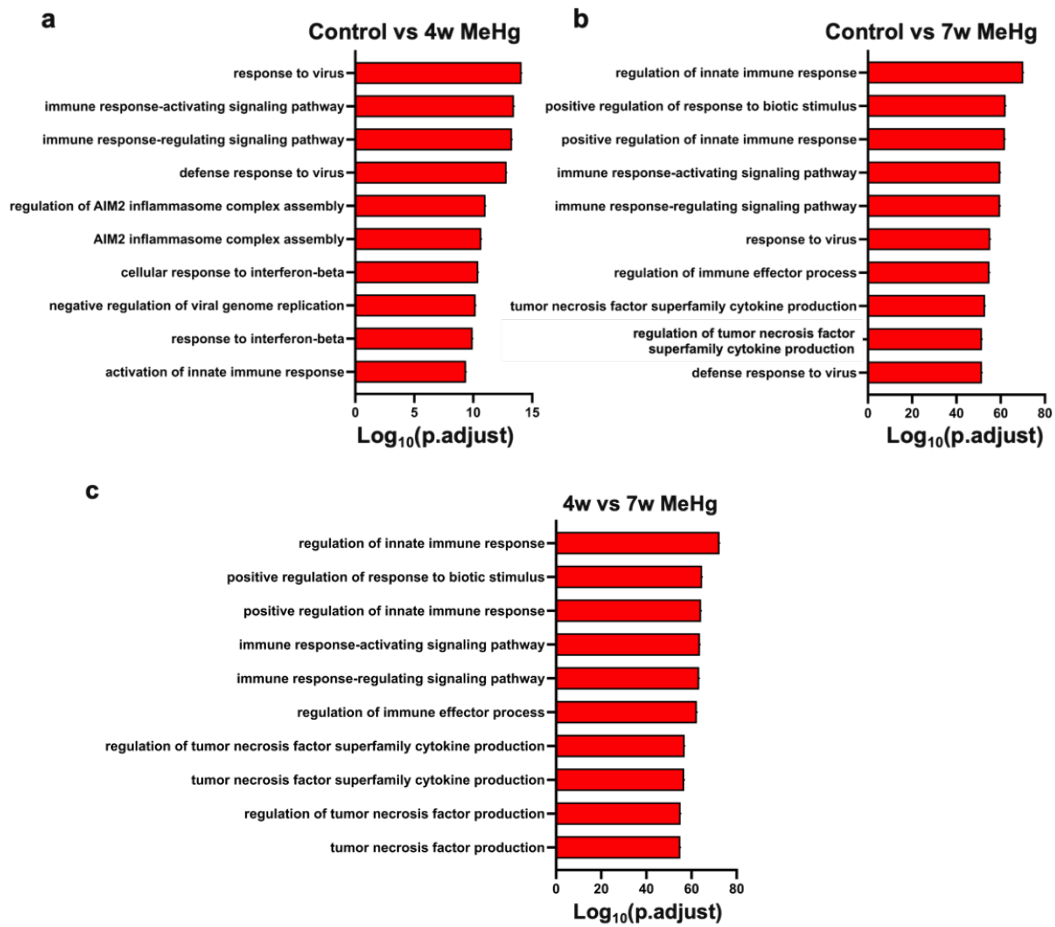


図 1 1. MeHg による遺伝子発現の変化

a, b, c : 群間で差次的に発現上昇した遺伝子の GO 解析結果

一方で小胞体ストレスや UPR に直接対応する GO タームはいずれの比較においても有意なエンリッチメントを示さなかった。また、サイトカイン産生やインターロイキン産生の負の制御に関する GO タームはダウンレギュレートされていた (図 12 a,b) 。さらに、4 週から 7 週にかけて、すなわち MeHg 曝露後期に特異的に抑制された GO タームが認められた。これらには、ニコチン、アルコール、コカインなどの薬物曝露時の行動変化と関連する成体行動 (adult behavior) 関連ターム、恐怖反応 (fear response) 関連ターム、筋収縮などの骨格筋機能に関するターム、アセチルコリンをはじめとする神経伝達物質関連タームが含まれていた。加えて、GABA 作動性神経の分化に関する GO タームもダウンレギュレートされていた (図 12 c) 。

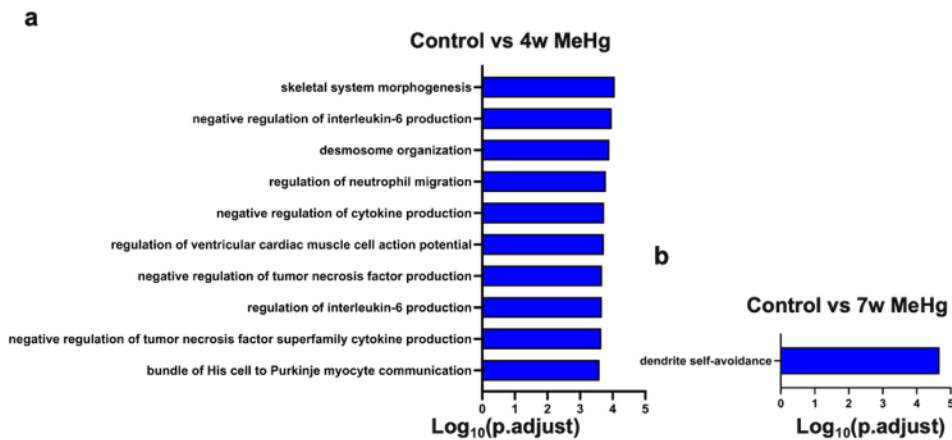


図 1 2. MeHg による遺伝子発現の変化
 a, b, c : 群間で差次的に発現低下した遺伝子の GO 解析結果

12. MeHg による嗅覚系神経障害惹起嗅覚系に対する MeHg の影響

本研究を進めるために、亜慢性 MeHg 毒性モデルを樹立した (図 13a)。以前の研究結果と一致して¹¹, 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 13b)。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 13c) 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 3. 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

13. 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。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 14a, 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 14c)。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 14d, 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14. MeHgによる嗅球における神経細胞死
a, b, c: TUNEL陽性細胞, d, e: NeuN陽性細胞

14. 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^{12,13}。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)、扁桃体皮質(COA)、嗅内皮質(IENT)からなるサブ領域である^{14,15}。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。これらの細胞数の増加は、PIRとvTTで顕著であった(図15a, 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15c, 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15b, 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。

図15. 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

15. 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^{15,16}。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16a, 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16c, d）。統計的に有意ではなかったが、無頭島皮質では、MeHgに曝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16a-d）。

図16. 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

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-フェニル酢酸が 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 誘導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 α 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 17)。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。

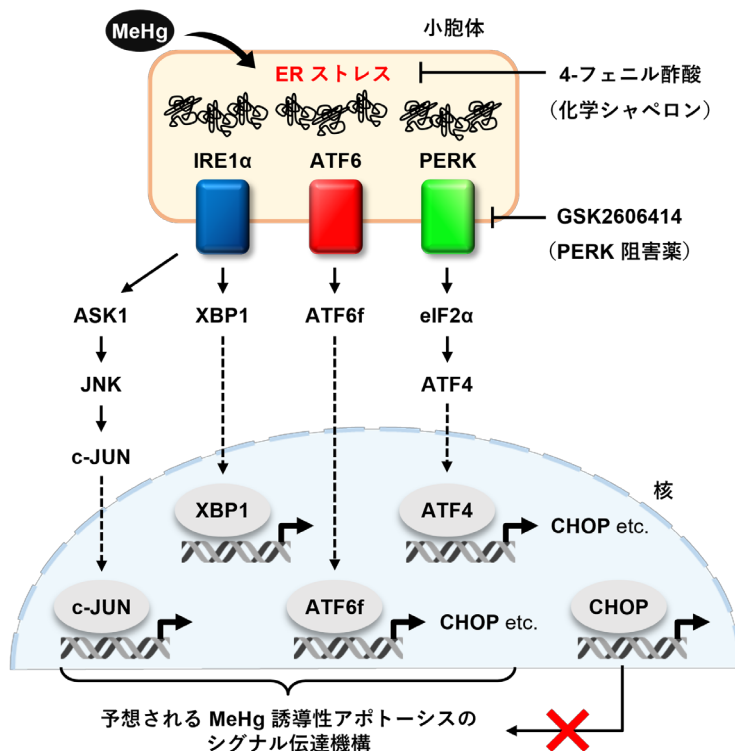


図 17. MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構の展望

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 1)。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 2) 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 3)。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 4)。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、30 ppm 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 5)。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^{17,18}、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 5)、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。

また、MeHg は小胞体ストレス及び UPR 依存的な神経細胞死と神経症状を惹起するが、この経路にアポトーシス関連因子である CHOP は寄与していないことがわかった。そこで、他の UPR 依存的な遺伝子発現が関与しているか否かを探った。MeHg 曝露脳に対する *in vivo* 網羅的遺伝子発現解析は、これまで小脳¹⁹や発生期²⁰での報告に限られており、成体マウスの主要障害部位である大脳皮質体性感覚野を対象とした RNA-seq 解析は本研究が初めての試みである。残念ながら、本 RNA-seq 解析においては、ER ストレス下流因子や ER ストレス関連 GO タームの有意な発現増加は捉えられず、主として免疫応答の活性化および行動・神経伝達・GABA 作動性神経分化に関連する遺伝子発現が認められた。この要因の一つとして、今回実施した RNA-seq はバルク組織を対象としており、体性感覚野で多数を占めるグリア細胞由来のシグナルが主に反映されている可能性が推定された。実際に MeHg はミクログリアを活性化し、炎症性サイトカインを放出させることが知られており²¹、本 RNA-seq で検出された免疫応答シグナルは、グリア反応を捉え

ている可能性が高い。今後は神経細胞のみを対象とした解析により、神経細胞特異的な遺伝子発現変化を検討する必要がある。

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 13)。嗅球の顆粒細胞層は MeHg 曝露に対して特に脆弱であり (図 14)、嗅覚処理に関与する皮質領域で神経細胞死が起こる (図 15 および 16)。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^{22,23}。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 14 および 15)。vTT と ORB は MeHg に対して特に脆弱であり (図 15)、神経細胞喪失の程度は血漿水銀濃度に強く反映された。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水俣病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²⁴。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²⁵。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^{26,27}、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²⁸。このように、アルツハイマー病と水俣病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 の軸索投射形成異常を含む損傷後の嗅覚地図の変化などである^{29,30}。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 14)、顆粒細胞を傷害し (図 14)、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 15 および 16)。したがって、これらの複数の障害が、水俣病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。

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。

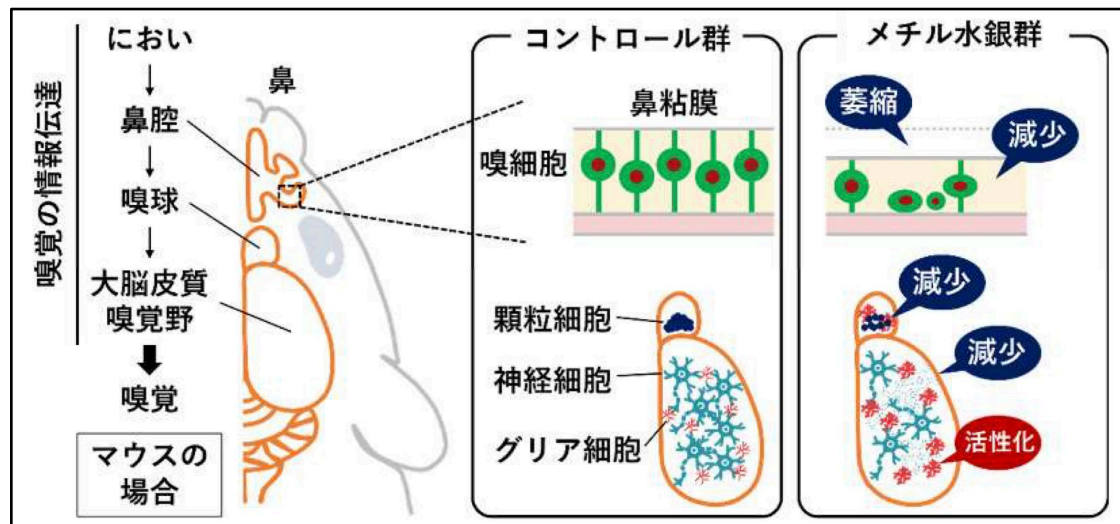


図 18 : メチル水銀の嗅覚系への作用

V 結論

1. 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
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 大脳皮質体性感覚野の RNA-seq 解析では、ER ストレス関連遺伝子の有意な上昇は認められなかった。
6. MeHg 曝露の慢性期にはグリア細胞由来であると推定される炎症・免疫応答遺伝子の発現上昇が主要な変動として捉えられた。加えて、GABA 作動性神経分化や成体行動・恐怖反応に関連する遺伝子群の発現低下が認められた。
7. 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。
8. 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。

9. 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。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。

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残されている。

1) 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。

2) 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。

さらに、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を明らかにしたが、今後解決しなければならない課題は以下の通りである。

3) 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。

4) 嗅覚伝導路以外の部位における MeHg 依存的神経細胞死の有無について、部位特異性神経種、生理的・病態生理的役割について、水俣病患者との比較をしつつ解明する必要がある。

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, 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 98(4):1163-1175. doi: 10.1007/s00204-024-03682-w.
- 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.

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. 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
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. Takeuchi T, Morikawa N, Matsumoto H, Shiraishi Y (1962) A pathological study of Minamata disease in Japan. *Acta Neuropathol* 2(1):40–57.
14. Schröder H, Moser N, Huggenberger S (2020) The Mouse Olfactory System Neuroanatomy of the Mouse. 319–331.
15. 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
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Hwang G-W, Lee J-Y, Ryoke K, Matsuyama F, Kim J-M, Takahashi T, Naganuma A (2011) Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury. *J Toxicol Sci* 36(3):389–391.
20. Glover CN, Zheng D, Jayashankar S, Sales GD, Hogstrand C, Lundebye A-K (2009) Methylmercury speciation influences brain gene expression and behavior in gestationally-exposed mice pups. *Toxicol Sci* 110(2):389–400.
21. Toyama T, Hoshi T, Noguchi T, Saito Y, Matsuzawa A, Naganuma A, Hwang G-W, et al. (2021) Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- α expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia. *Sci Rep* 11:9832.
22. Eto K (1997) Pathology of Minamata disease. *Toxicol Pathol* 25(6):614–623
23. Harada M (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25(1):1–24.
24. 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.
25. 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.

26. Igarashi KM (2023) Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 46(2):124–136.
27. 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.
28. 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.
29. Altundag A (2023) Parosmia and phantosmia: managing quality disorders. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 11(1):19–26.
30. 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.

英文要約 (Abstract)

Previous studies have demonstrated that exposure to methylmercury (MeHg) induces endoplasmic reticulum (ER) stress in a neuron-specific manner in the mouse brain, subsequently leading to apoptotic cell death. Initial investigations further indicated that administration of the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid (4-PBA), which alleviates ER stress, suppresses the MeHg-induced unfolded protein response (UPR) and attenuates neurological manifestations, including hindlimb extension deficits. To further delineate the therapeutic efficacy and treatment time window of 4-PBA, the effective period for intervention was systematically examined. It was observed that significant improvement of neurological symptoms was observed even when 4-PBA administration was initiated two weeks after MeHg exposure.

To clarify the molecular mechanisms underlying ER stress-mediated neuronal cell death, the involvement of C/EBP homologous protein (CHOP), a pro-apoptotic factor downstream of the UPR, was evaluated. No significant suppression of neuronal cell death was observed in MeHg-treated CHOP knockout mice. Subsequently, to comprehensively characterize ER stress-dependent gene expression profiles, RNA sequencing analysis was conducted using brain tissues from the primary somatosensory cortex of MeHg-exposed mice. Analysis of the transcriptomic data revealed marked upregulation of genes associated with inflammatory and immune responses, presumably of glial origin, whereas no significant induction of ER stress-related genes was detected.

Regarding the anatomical distribution of MeHg-induced neuronal cell death, previous reports have primarily focused on the cerebral cortex and striatum, and comprehensive analyses of other brain regions have remained limited. Therefore, TUNEL staining was performed on brain sections from MeHg-exposed mice, and the presence of apoptotic cells was systematically examined across all brain regions. Apoptosis-like cell death was newly identified in the olfactory bulb and cortical regions involved in olfactory signal transmission.

Although the present study identified novel brain regions susceptible to methylmercury (MeHg)-induced neuronal cell death in the mouse brain and clarified the therapeutic time window of 4-phenylbutyric acid (4-PBA), several important issues remain to be addressed. 1) Further elucidation of the molecular and cellular mechanisms underlying MeHg-induced neuronal cell death is required. 2) Comprehensive identification of

brain regions in which MeHg exposure induces neuronal cell death remains necessary. 3) The involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in neuronal cell death along the olfactory pathway should be examined in detail. 4) It is necessary to clarify whether MeHg-dependent neuronal cell death occurs in brain regions outside the olfactory pathway, including the regional specificity of neuronal subtypes and their physiological and pathophysiological roles, through comparative analyses with neuropathological findings in patients with Minamata disease.