

メチル水銀誘発性末梢感覚神経障害への非神経細胞の寄与

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

水俣病は中枢神経障害（ハンター・ラッセル症候群）として理解されてきたが、初期にみられる末梢神経障害、とくに感覚神経優位な障害の機序は十分に解明されていない。本研究では、メチル水銀（MeHg）曝露ラットで観察される痛覚特異的鈍麻と回復、末梢感覚神経軸索の一過的損傷と回復、後根神経節（DRG）における感覚神経マーカー遺伝子の一過的減少と回復、およびマクロファージ（Mφ）の集積と貪食性 Mφ の一過的増加といった既知の所見を踏まえ、DRG で変容する非神経細胞である Mφ およびサテライトグリア細胞（SGC）の神経損傷への寄与を明らかにすることを目的とした。Wistar 雄ラットに MeHgCl（6.7 mg/kg/day）を 5 日投与 2 日未投与のサイクルで 1~2 週間経胃投与した後、DRG を採取し、トランスクリプトーム解析および免疫組織学的解析を実施した。単一核 RNA シークエンス解析（snRNA-seq）を目的とした核抽出では、DRG の組織特性に起因して十分な核数が得られず QC 基準を満たさなかったため、解析手法を空間トランスクリプトミクスへ変更し、サンプル調製と最適透過条件（15 分）を決定した。さらに NeuN（ニューロンマーカー）および GS（SGC マーカー）を用いた免疫染色により SGC 動態を解析した結果、GS 陽性 SGC に密に取り囲まれたニューロン（SGC-wrapped neuron）の割合がメチル水銀（MeHg）曝露後 Day14 から有意に低下し、この低下が Day70 まで持続することが観察された。以上より、MeHg 曝露は DRG において SGC のラッピング状態に長期的変化をもたらす可能性が示唆された。今後、空間トランスクリプトーム解析の結果と併せて、GS の発現変動や SGC の退縮・細胞死などを含む病態機序の詳細解明が必要である。

キーワード: 末梢神経障害、マクロファージ (Mφ)、サテライトグリア細胞 (SGC)、感覚神経、後根神経節 (DRG)

I 研究目的

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¹⁾。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。本研究はこれまでに我々のグループにおいて明らかにした「MeHg による末梢感覚神経優位な神経損傷と、痛覚特異的障害およびその回復」について、これに非神経細胞が寄与するメカニズムに迫る研究である。これまで MeHg 曝露ラットにおいて痛覚特異的鈍麻と回復が観察²⁾され、末梢感覚神経軸索の一過的損傷と回復^{3,4)}、後根神経節 (DRG) における各種感覚担当神経細胞の特異的マーカー遺伝子の一過的減少と回復⁵⁾、マクロファージ (Mφ) の恒常的集積と貪食性 Mφ の一過的増加^{未発表}などを見出してきた。一方で、DRG に集積した Mφ や一過的に増加する貪食性 Mφ が上記軸索損傷や神経細胞の遺伝子発現変化に与える影響は、マウスにおいて Mφ 由来の TNFα 分泌が神経細胞死に関与する可能性が *in vitro* の研究により示唆されたものの⁶⁾、詳細は明らかにされていない。また、DRG において神経細胞を密に取り囲んでいるサテライトグリア細胞 (SGC) は、神経細胞を物理的・化学的に外界から遮蔽し、かつ種々の因子を分泌することでその恒常性維持に寄与していると考えられている^{7,8)}。我々はこれまでに MeHg 曝露による SGC の形態変容^{未発表}と、主に SGC が分泌すると考えられているグリア由来神経栄養因子 (GDNF) の発現増加^{3,5)}を見出しているが、SGC の MeHg 曝露時の細胞内応答と、それが神経の上記イベントにどのような影響を与えているかも明らかにされていない。そこで本研究では、DRG で変容する2つの非神経細胞に着目し、MeHg 曝露ラット DRG における①Mφ と②SGC の神経損傷への寄与という2点について明らかにすることを目的とする。

II 材料と方法

1. 動物飼育と MeHg 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 MeHgCl₂ 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。コントロールラットには体重あたり同量の水を投与した。

2. DRG 標本作成

snRNA-seq 用 DRG サンプル調製では、コントロールラットおよび MeHg 投与したラットを投与開始 14, 70 日後に二酸化炭素で深麻酔し、素早く腰椎 (L4-L5) DRG を摘出、-80°C で凍結した。凍結したサンプルはノボジーン社に冷凍送付し、同社標準プロトコルにより核抽出後、核数をカウントした (QC)。空間トランスクリプトミクス用 DRG サンプル調製では、上述の同一ラット群を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。腰椎 (L4-L5) より DRG を摘出し、4%PFA / 0.1 M PB 溶液で 4°C 8 時間固定し、20% sucrose / PBS 溶液に 4°C 一昼夜置換後、OCT コンパウンドに包埋した。包埋サンプルは Mirxes 社に送付し、クライオスタットにて切片作成後、P-chip にて permeabilization 条件を決定、解析チップにサンプルを貼り付けして解析した。免疫染色用 DRG サンプルはコントロール、Day7、14、28、42、56、70 の個体より上述灌流固定と同様の手法により調製し、OCT 包埋したサンプルをクライオスタットにて 14 μm 厚の切片にし、常法に従って抗 NeuN 抗体および抗 GS 抗

体を用いて蛍光染色を行った。染色した切片は蛍光顕微鏡により撮影し、細胞や DRG 面積について Photoshop または ImageJ により定量評価した。

(倫理面への配慮等)

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動物委員会で承認された内容、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。MeHg 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が定める廃棄手順に従い適切に廃棄した。

III 研究結果

1. snRNA-seq サンプル調製と QC

snRNA-seq を行う目的で、コントロール、Day14、70 のラットより新鮮 DRG の摘出を行い、ノボジーン社の標準プロトコルによる核抽出と QC を行ったところ、snRNA-seq に必要な核数を得ることができなかった (Table 1 & Fig. 1)。これは DRG が他の組織と比べてコラーゲンを多く含む組織であることから、コラゲナーゼ処理を伴わない通常の組織処理では核抽出効率が悪かったためと考えられる。コラゲナーゼ処理を含む核抽出条件検討を行う方向性も考えられたが、次節の空間トランスクリプトミクス用サンプルはこれまで我々が定常的に行っている灌流固定—組織摘出—凍結包埋という手法でのサンプル調製が可能であったため、空間トランスクリプトミクス用サンプル調製に変更した。

Table 1. QC summary

Sample	Nuclei concentration (#/ μ L)	Nuclei size gating (μ m)	Cell viability (%)	Number of targeted nuclei recovery
MeHg14_DRG1&2	125	1 to 10	9.6	20,000

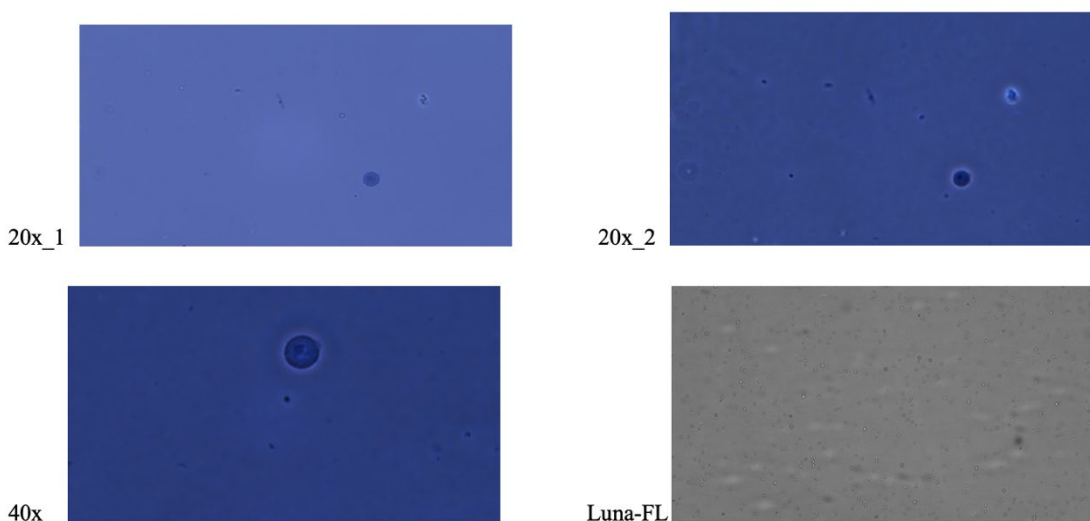


Fig. 1. Microscope images

2. 空間トランスクリプトミクスサンプル調製と QC

空間トランスクリプトミクスを行う目的で、コントロール、Day14、70 のラットを灌流固定し、凍結包埋ブロックサンプルを調製した。ブロックサンプルを Mirxes 社に送付して凍結切片作成後、permeabilization 条件検討を行い、最適条件を 15 分と決定した (Fig. 2)。

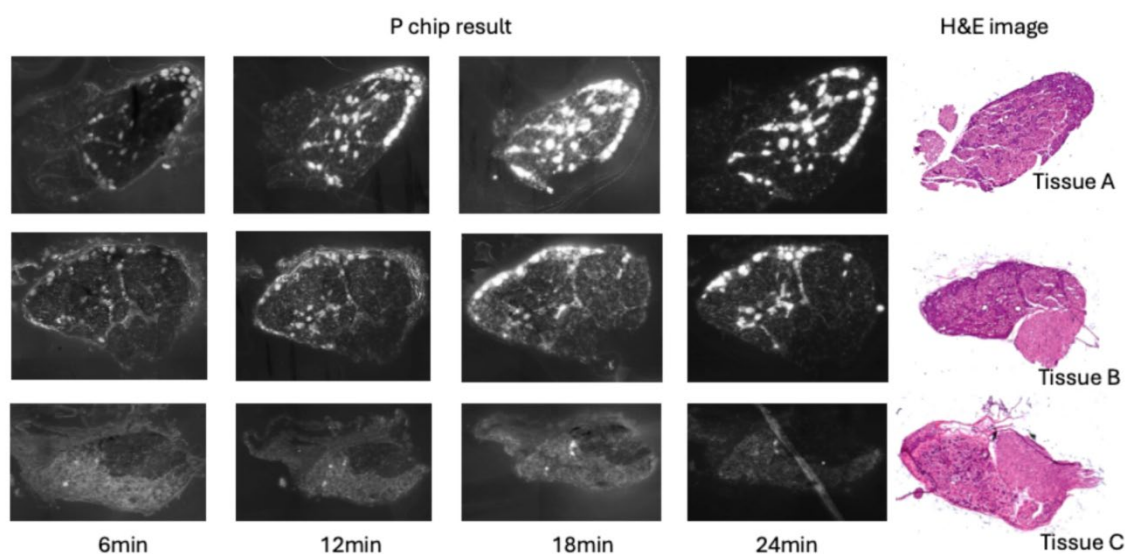


Fig. 2. P-chip result.

3. SGC-wrapped neuron の恒常的減少

MeHg 曝露による SGC 動態への経時的影響を調べるために、ニューロンマーカーである NeuN、SGC マーカーである GS それぞれの特異的抗体を用いて免疫染色を行い、GS 陽性 SGC に密にパッキングされている神経細胞 (SGC-wrapped neuron) と、パッキングされていない神経細胞 (SGC-nonwrapped neuron) をカウントしたところ、全神経細胞数に対する SGC-wrapped neuron 数の割合が Day14 より有意に減少し、この減少が Day70 まで持続することが明らかになった (未発表データのため非掲載)。

IV 考察

今期は本研究の初年度として、トランスクリプトーム解析の初期段階および免疫染色による SGC の経時的動態解析を行った。その結果、snRNA-seq サンプルは QC 基準を満たすことができなかったため、空間トランスクリプトーム解析に変更し、サンプル調製から QC までの工程を完了した。免疫染色による SGC の動態については、MeHg 曝露により持続的に SGC-wrapped neuron の数が減少することが明らかになった。

クオリティの高い snRNA-seq サンプルが調製できなかった理由としては、①ノボジーン社の snRNA-seq 用サンプル調製プロトコルは標準的なものであり、比較的コラーゲンを多く含む DRG からの核抽出には不向きであったこと、②同社のサービス内容に標準プロトコルの変更や新たな

条件検討が含まれていないことが挙げられる。そのため、代替案としてコラゲナーゼを使用した DRG 組織からの細胞分散条件をこちらで出したとしても、核抽出したものは凍結せず直ちにシーケンス経路に流す必要があったため現実的には困難であると思われた。一方で空間トランスクリプトーム解析はそのサンプル調製法のフローがこれまでにやってきた手技とほとんど同一であったため、解析に適したサンプルを調製できた。なお、遺伝子発現解析結果については今後提出される予定であり、詳細な解析は次年度に報告する。

MeHg 曝露による DRG の SGC 動態の解析の結果、興味深い点が 2 つ明らかになった。1 つ目は全ての DRG ニューロンが SGC で密にラッピングされているわけではなく、コントロールレベルで 80% 程度のニューロンがラッピングされているということである。2 つ目は SGC に取り囲まれた神経細胞の割合が Day14 から Day70 まで持続的に低下していたことである。1 つ目については、これまでに 15-25% の神経細胞が SGC を介することなく直接隣の神経細胞とクラスターを形成しているとする報告⁹⁾と相関するかもしれない。2 つ目については 1 つの可能性として、SGC が通常発現している GS の発現が持続的に抑制されることで免疫組織化学で陰性となることで、見かけの SGC-wrapped neuron の割合が減少していることが考えられる。もう 1 つの可能性としては SGC 自体が退縮あるいは細胞死を引き起こすことで、SGC に取り囲まれた神経細胞数が減少した可能性が考えられる。しかしながら、そのどちらの病態であるとしても似たような病態を示した例はこれまでになく、電子顕微鏡解析などによるミクロな形態を解析する必要があると考える。いずれにせよ空間トランスクリプトーム解析結果が出ることにより上記の問題に一定の解が得られるものと思われる。

V 結論

本研究は、水俣病の初期にみられる末梢感覚神経優位な障害機序の解明を目的として、MeHg 曝露ラット DRG における非神経細胞 (Mφ および SGC) の関与に着目し、トランスクリプトーム解析基盤の構築と免疫組織学的解析を実施した。その結果、snRNA-seq は DRG 特有の組織性状により核抽出効率が十分得られず QC 基準を満足するに至らなかった。一方、空間トランスクリプトミクスへ解析系を移行することでサンプル調製および QC を完了し、今後の包括的解析に向けた実施体制を確立した。また、NeuN および GS の免疫染色による経時解析から、SGC-wrapped neuron の割合が MeHg 曝露後 Day14 から有意に低下し、その変化が Day70 まで持続することを見出し、MeHg 曝露が DRG の SGC—ニューロン相互作用に長期的変容をもたらす可能性が示唆された。以上より、MeHg による末梢感覚障害には DRG の非神経細胞動態が関与することが強く示され、空間トランスクリプトーム解析結果と形態学的検証を統合することで、Mφ および SGC を介した神経損傷・回復機構の解明が今後の重要課題である。

VI 今後の課題

今後の課題として、以下 6 点について明らかにすることを目指す。

① MeHg 曝露後に観察された SGC-wrapped neuron の持続的減少が「SGC 自体の退縮・脱落」なのか「SGC は存在するが GS 発現低下により検出されにくい状態」なのかを判別するため、GS 以外の複数 SGC マーカーや細胞死指標を組み合わせた定量解析を行い、病態の本態を明確化する。

- ②次に、ラッピング不全が被覆層数の減少、被覆の断裂、ニューロンクラスター形成の増加など、どの形態学的変化として生じているかを解像度高く検証するため、電子顕微鏡解析を含む超微形態評価を導入し、SGC—ニューロン境界の構造変化を定義する。
- ③さらに、空間トランスクリプトミクス解析を本格化させ、DRG内におけるMφ・SGC・各感覚ニューロンサブタイプの局在と遺伝子発現変動を統合的に把握することで、炎症・損傷・修復に関わる分子ネットワークを空間情報として可視化する。
- ④加えて、恒常的に集積するMφおよび一過的に増加する貪食性Mφが、軸索損傷や回復過程に対して促進的/抑制的のいずれに働くのかを明らかにするため、Mφの表現型(炎症性・貪食性・サイトカイン発現)を時系列に解析し、神経損傷イベントとの因果的関連をin vivo およびin vitroの双方で検討する。
- ⑤また、SGCの形態変容および分泌因子(GDNFなど)の変化が、痛覚特異的鈍麻と回復、末梢感覚軸索の損傷・再生、DRG感覚マーカー遺伝子の一過的変動とどのように結びつくかを同一時間軸で対応付け、非神経細胞を介した感覚障害発症機序の全体像を構築する。
- ⑥最後に、Day70まで持続するSGC-wrapped neuron 低下という長期変化の生理学的意義を、単なる急性障害ではなく慢性的な微小環境再編として捉え直し、MeHg曝露後の末梢感覚系における恒常性破綻や慢性症状形成への寄与まで含めた長期的病態モデルの確立を目指す。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Yo Shinoda, Kaito Yamashiro, Ayaka Matsuki, Yuka Sekiguchi, Satoshi Tatsumi, Shino Homma Takeda, Oki Sekizawa, Marika Abe, Misaki Ozawa, Eiko Yoshida, Yasuhiro Shinkai, Tsutomu Takahashi, Yasuyuki Fujiwara, Toshiyuki Kaji. Reversible Neurotoxic Effects of Methylmercury on the Dorsal Root Ganglion: Temporal Dynamics in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 27(1), 116 (2026).
- 2) Eiko Yoshida, Kenta Sakurai, Akishige Hirata, Tomoko Sasaoka, Takashi Hirooka, Tomoya Fujie, Takato Hara, Chika Yamamoto, Yasuyuki Fujiwara, Yo Shinoda, Komyo Eto, Toshiyuki Kaji. Induction of VEGF-A expression by methylmercury is mediated by the EGFR-p38 MAPK-COX-2-PKA pathway in cultured human brain microvascular pericytes. *J. Toxicol. Sci.* 50(4), 199-204 (2025).
- 3) Tsuyoshi Nakano, Eiko Yoshida, Yu Sasaki, Shigekatsu Kazama, Fumika Katami, Kazuhiro Aoki, Tomoya Fujie, Ke Du, Takato Hara, Chika Yamamoto, Tsutomu Takahashi, Yasuyuki Fujiwara, Komyo Eto, Yoichiro Iwakura, Yo Shinoda and Toshiyuki Kaji. Mechanisms Underlying Sensory Nerve-Predominant Damage by Methylmercury in the Peripheral Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 25(21), 11672 (2024).
- 4) Eiko Yoshida, Kazuhiro Aoki, Yu Sasaki, Hinako Izuhara, Tsutomu Takahashi, Yasuyuki Fujiwara, Tomoya Fujie, Ke Du, Komyo Eto, Yo Shinoda, Toshiyuki Kaji. 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(5), 241-248 (2024).
- 5) Yo Shinoda, Masahiro Akiyama, and Takashi Toyama. Potential association between methylmercury neurotoxicity and inflammation. *Biol. Pharm. Bull.* 46(9), 1162-1168 (2023).
- 6) Yo Shinoda, Yuta Yamada, Eiko Yoshida, Tsutomu Takahashi, Yayoi Tsuneoka, Komyo Eto, Toshiyuki Kaji, and Yasuyuki Fujiwara. Hypoalgesia and recovery in methylmercury-exposed rats. *J. Toxicol. Sci.* 46(6), 303-

309 (2021).

- 7) Yo Shinoda, Satoshi Tatsumi, Eiko Yoshida, Tsutomu Takahashi, Komyo Eto, Toshiyuki Kaji, Yasuyuki Fujiwara. Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats. *J. Toxicol. Sci.* 44(8), 549-558 (2019).
- 8) Yo Shinoda, Shunsuke Ehara, Satoshi Tatsumi, Eiko Yoshida, Tsutomu Takahashi, Komyo Eto, Toshiyuki Kaji, Yasuyuki Fujiwara. 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(3), 191-199 (2019).

引用文献

- 1) Eto K. Pathology of minamata disease. *Toxicol. Pathol.*, 25, 614-623 (1997).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Shinoda Y, Yamashiro K, Matsuki A, Sekiguchi Y, Tatsumi S, Homma-Takeda S, Sekizawa O, Abe M, Ozawa M, Yoshida E, Shinkai Y, Takahashi T, Fujiwara Y, Kaji T. The reversible neurotoxic effects of methylmercury on the dorsal root ganglion: Temporal dynamics in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, 27, 116 (2025).
- 6) 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, 2111672 (2024).
- 7) Andreeva D, Murashova L, Burzak N, Dyachuk V. Satellite glial cells: Morphology, functional heterogeneity, and role in pain. *Front. Cell. Neurosci.*, 16, 1019449 (2022).
- 8) Meriau P, Kuruvilla R, Cavalli V. Satellite glial cells: Shaping peripheral input into the brain-body axis? *Neuron*, 113, 3333-3351 (2025).
- 9) Pannese E, Ledda M, Arcidiacono G, Rigamonti L. Clusters of nerve cell bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. *Cell Tissue Res.*, 264, 209-214 (1991).

英文要約 (Abstract)

Minamata disease has long been understood as a central nervous system disorder (Hunter–Russell syndrome); however, the mechanisms underlying the peripheral neuropathy observed in the early stage, particularly sensory-dominant impairment, remain insufficiently elucidated. In this study, based on previously reported findings in methylmercury (MeHg)-exposed rats—namely, pain-specific hypoalgesia and subsequent recovery, transient injury and recovery of peripheral sensory axons, transient decreases and recovery of sensory neuron marker genes in the dorsal root ganglia (DRG), and persistent macrophage (Mφ)

accumulation with a transient increase in phagocytic M ϕ —we aimed to clarify the contribution of non-neuronal cells altered in the DRG, specifically M ϕ and satellite glial cells (SGCs), to neural injury. Male Wistar rats were administered MeHgCl (6.7 mg/kg/day) intragastrically for 1–2 weeks in a regimen of 5 consecutive days of dosing followed by 2 days off, and transcriptomic and immunohistological analyses were performed using DRG samples. During nuclei extraction for snRNA-seq, an insufficient number of nuclei were obtained due to the tissue characteristics of the DRG, and the samples failed quality control; therefore, the analytical approach was switched to spatial transcriptomics, and sample preparation procedures and the optimal permeabilization condition (15 min) were established. In addition, immunostaining with NeuN and GS to evaluate SGC dynamics revealed that the proportion of neurons densely surrounded by GS-positive SGCs (SGC-wrapped neurons) was significantly reduced from Day 14 after MeHg exposure, and this reduction persisted through Day 70. These findings suggest that MeHg exposure induces long-term alterations in the SGC-wrapping status within the DRG, and further investigation is required to elucidate the underlying pathological mechanisms, including changes in GS expression and SGC retraction or cell death, in conjunction with spatial transcriptomic results.