

神経細胞とミクログリア間のネットワーク攪乱を介した メチル水銀による運動機能障害機構

主任研究者 黄 基旭
東北医科薬科大学 薬学部 教授

研究要旨

我々はこれまでに、ミクログリア活性の低いモデルマウスを用いた検討により、メチル水銀はミクログリアを過剰に活性化させることで脳神経障害を引き起こすことを明らかにしてきた。興味深いことに、メチル水銀は炎症性サイトカインを発現誘導することなくミクログリアの活性化を介して神経細胞傷害を引き起こした。また、神経細胞傷害が観察された運動野において、ミクログリア活性化の抑制因子である CX3CL1 の発現が神経細胞で低下していた。CX3CL1 は神経細胞に選択的に発現しており、ミクログリアの細胞膜に存在する CX3CR1 と相互作用することでミクログリアの活性化を抑制している。すなわち、メチル水銀は神経細胞とミクログリア間のネットワーク形成に関わる CX3CL1/CX3CR1 シグナル系を破綻させることでミクログリアを活性化し、これが神経細胞損傷を惹起する要因として働く可能性がある。そこで、メチル水銀曝露マウスの運動野における CX3CL1 および CX3CR1 発現を経時的に観察したところ、CX3CL1 の発現は曝露 1 週目から減少していたのに対し、CX3CR1 の発現は曝露 2~3 週目から減少傾向を示した。また、ミクログリアの活性化指標である CD68 に対して陽性を示したミクログリアも曝露 2 週目から増加傾向を示した。これらのことから、メチル水銀は神経細胞での CX3CL1 の発現を減少させることでミクログリアを活性化していることが示唆された。さらに、神経細胞モデルとして C17.2 細胞を用いた検討により、メチル水銀は CX3CL1 mRNA 量にほとんど影響せず、当該蛋白質量を減少させていた。このことから、メチル水銀は CX3CL1 蛋白質の翻訳後修飾や安定性などに影響を与えることで、当該蛋白質の減少に関与している可能性が考えられる。今後、メチル水銀による CX3CL1 の発現減少に関わる分子機構をモデル細胞株やマウスの脳スライスを用いて解明することでメチル水銀によるミクログリアの活性化を介した脳機能障害機構の全容が明らかになるものと期待される。

キーワード：メチル水銀、ミクログリア、CX3CL1

研究協力者

山縣 涼太（東北医科薬科大学薬学部助教）

山下 直哉（東北医科薬科大学薬学部助教）

I 研究目的

我々はこれまでに、ミクログリア活性の低いモデルマウスを用いた検討により、メチル水銀はミクログリアの過剰な活性化を介して神経細胞損傷を惹起することを明らかにしてきた。また、本曝露条件下では、マウスの体重減少や自発運動量の低下などの明確な全身毒性は認められなかったにも関わらず、記憶機能および運動機能の有意な低下が観察された。興味深いことに、メチル水銀は炎症性サイトカインの顕著な発現誘導を伴うことなくミクログリアの活性化を介した神経細胞損傷を惹起した。さらに、神経細胞障害が観察された運動野では、細胞傷害型ミクログリアの増加とともに神経細胞由来 CX3CL1 発現が低下していた。この CX3CL1 は神経細胞で選択的に発現し、ミクログリア細胞膜上の受容体である CX3CR1 との相互作用を介してミクログリアの活性化を抑制する代表的制御因子である。したがって、メチル水銀は神経細胞-ミクログリア間のシグナル制御機構を攪乱することでミクログリア機能異常を誘導し、これが神経細胞損傷の基盤となる可能性が考えられる。これまでに、CX3CL1/CX3CR1 シグナル系に加え、CD200/CD200R シグナル系もミクログリアの機能制御に関与することが知られている。しかしながら、これら細胞間ネットワーク形成因子に対するメチル水銀の影響および毒性発現との関連性については体系的な検討が行われていない。そこで本研究では、神経細胞-ミクログリア間のネットワーク形成因子に着目し、CX3CL1/CX3CR1 系および CD200/CD200R 系を中心とした分子変動をマウス個体で経時的に評価するとともに、その変動機構をモデル細胞株およびマウス脳スライスを用いて明らかにすることを目的とした。

II 材料と方法

1. マウスの飼育とメチル水銀曝露

5-6 週齢の雄性 C57BL/6N マウスは、実験に供するまで温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明期 7:00-19:00、暗期 19:00-7:00) に管理されている環境下で飼育した。なお、プラスチックケージ (縦 30 cm × 横 20 cm × 高さ 15 cm) につき 4 匹ずつ飼育した。飼育期間中は、固形飼料 CE-2 (日本クレア) および水を自由に摂取させた。実験期間中は、終濃度 30 ppm の塩化メチル水銀を含む飲料水を 6-7 週齢の雄性マウスに最大 8 週間自由摂取させた。コントロール群には、還元型グルタチオンのみ (塩化メチル水銀投与群と等量) を含む蒸留水に溶解させた飲料水を同期間摂取させた。

2. 脳組織を用いた免疫蛍光染色

三種混合麻酔薬 (Medetomidine、Midazolam、Butorphanol) を用いて麻酔したマウスを開腹した後、心臓の心尖部から左心室内にカニューレを挿入し、血液と灌流液を排出させるために右心室の一部を切開した。一定の流速 (5 mL/min) で PBS を 20 mL 灌流し脱血した後、直ちに氷冷した 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (固定液) を同じ流速で 40 mL 灌流し、組織を固定した。灌流固定後、脳を摘出し 4°C の固定液に浸して再固定を行った。ホルマリン固定した脳組織から、NeoLinearSlicer-AT (堂阪イーエム) を用いて脳切片 (30 μm スライス) を作製した。得られた脳切片は PBS で 15 分おきに 2 回洗浄した後、10% NGS or NDS-in PBS で 1 時間ブロッキングした。その後、PBS で 15 分おきに 2 回洗浄し、1% NGS または NDS in PBS で希釈した一次抗体と

4°Cで一晩反応させた。サンプルをPBSで30分おきに4回洗浄後、1%NGS or NDS in PBSで希釈した二次抗体と4°Cで一晩反応させた。PBSで30分おきに4回洗浄後、SlowFade™ diamond antifade mountantを滴下し、カバーガラスで封入した。免疫蛍光はC2 confocal microscope system (Nikon)を用いて可視化した。

3. 遺伝子発現量

マウス脳由来の神経幹細胞株 (C17.2) とミクログリア細胞株 (BV2) を 5×10^4 cells/0.45 mL/well となるように 24-well plate に播種し、24 時間後に 50 μ L のメチル水銀溶液で終濃度 4 μ M となるように経時的に処理した。培地を除去し、Isogen II で細胞を溶解した後、総 RNA を単離し、PrimeScript RT reagent kit を用いて cDNA を作製した。qPCR は SYBR Premix Ex Taq を用いて LightCycler 96 System により行い、mRNA 量を測定した。なお、内部標準として GAPDH を用いて mRNA 量を補正した。

4. 蛋白質発現量

C17.2 細胞と BV2 細胞をそれぞれ 5×10^4 cells/0.45 mL/well となるように 24-well plate に播種し、24 時間後に 50 μ L のメチル水銀溶液で終濃度 4 μ M となるように経時的に処理した。培地を除去し、2% SDS 溶液で細胞を溶解した後、95°C で 5 分間加熱した。DC Protein Assay Kit を用いて、蛋白質濃度を測定した後、4 \times sample buffer を用いて SDS-PAGE 用サンプルを調製した。SDS-PAGE 後のゲルをセミドライ型の転写装置を用いて PVDF メンブレンに転写した後、5% スキムミルク含有 TTBS で 1 時間ブロッキングした。TTBS および TBS で洗浄した後、一次抗体に浸し 4°C で一晩振とう反応させた。TTBS と TBS で洗浄した後、二次抗体に浸し、2 時間以上振とう反応させた。TTBS と TBS で洗浄した後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate により化学発光させ、ChemiDoc™ Touch により検出した。

5. 統計処理

平均値 (means) \pm 標準誤差 (SEM) で示した。群間の有意差検定には、1 元配置分散分析後に Dunnett の多重比較検定を用いた。すべての検定法において危険率 5% 未満を統計的に有意であるとみなした。なお、統計解析には GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc) を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、東北医科薬科大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北医科薬科大学における動物実験等に関する規程」に従って実施した。

III 研究結果

1. CX3CL1 および CX3CR1 免疫染色法の最適化

CX3CL1 および CX3CR1 は膜結合型蛋白質であり、抗体の組織透過性、非特異的結合、ならびにシグナル検出感度の影響を受けやすいことが知られている。予備検討の際に採用した従来の染

色条件では、CX3CL1に対する十分な強度の染色シグナルが得られず、またCX3CR1においては非特異的と考えられる染色像が観察され、分子局在の評価および解析精度に課題が認められた (Fig. 1A)。そこで本研究では、染色条件の最適化を目的として、組織切片厚、透過処理条件、ブロッキング条件および抗体希釈倍率について系統的な検討を行った。その結果、CX3CL1 および CX3CR1 の免疫染色では抗原賦活処理を行わず、30 μm 厚の凍結切片を用い、0.3% Triton X-100 による透過処理を適用する条件を共通基本条件として設定した。ブロッキング条件は、CX3CL1 が 10% Normal Donkey Serum (室温、45 分間)、CX3CR1 が 20% Normal Donkey Serum (4°C、24 時間) の条件で最も良好な結果を得た。一次抗体反応は、CX3CL1 抗体を 1:200、CX3CR1 抗体を 1:1600 で希釈し、また反応時間は CX3CL1 が 4°C、48 時間、CX3CR1 が 4°C、24 時間を最適条件とした。二次抗体の反応条件は、CX3CL1 が 4°C、24 時間、CX3CR1 が室温 2 時間を最適条件とした。以上より、神経細胞に発現する CX3CL1 ならびにミクログリアに発現する CX3CR1 の特異的染色像を安定に取得可能となり、CX3CL1 および CX3CR1 の発現変動を高精度で評価する実験系が確立された (Fig. 1B)。

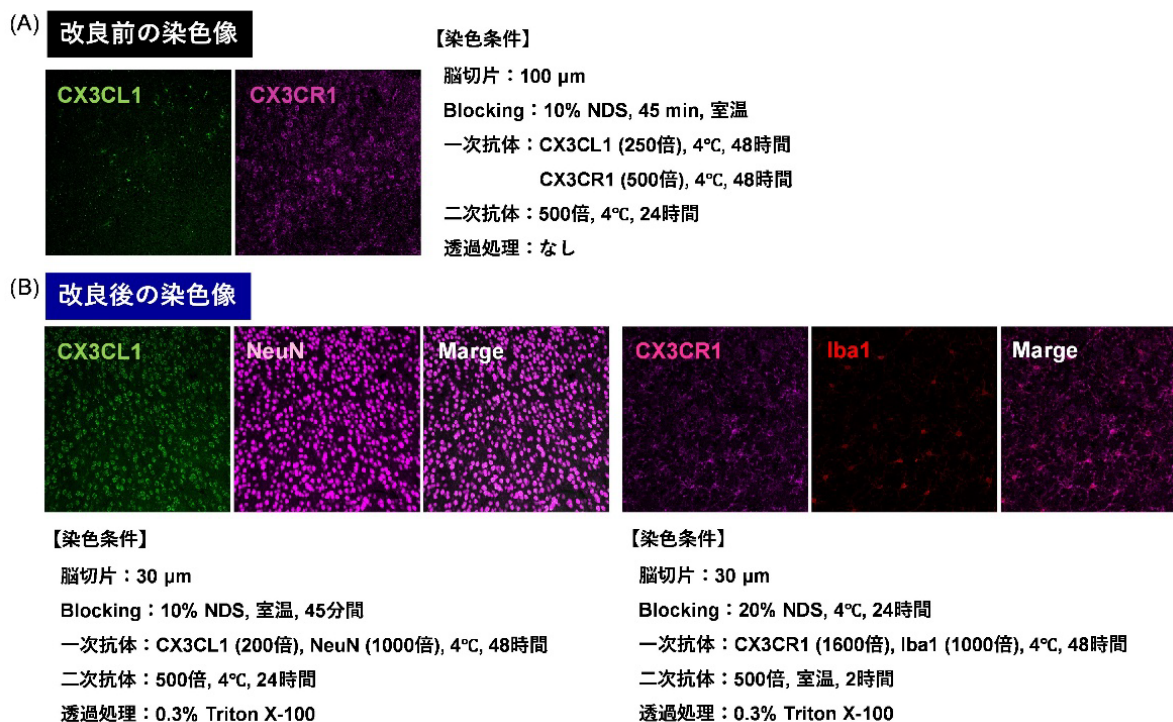


Fig. 1 CX3CL1 および CX3CR1 に対する免疫染色条件の最適化

(A) 免疫染色条件改良前の単染色像。シグナルは弱く、不明瞭であった。

(B) 免疫染色条件改良後の共染色像。CX3CL1 は NeuN 陽性細胞と、CX3CR1 は Iba1 陽性細胞とそれぞれ共局在を示し、各因子が神経細胞とミクログリアにそれぞれ発現していた。

2. メチル水銀曝露マウスの運動野における CX3CL1 および CX3CR1 の発現変動

これまでに神経細胞傷害が観察された運動野では、細胞傷害型ミクログリアの増加とともに神

神経細胞由来 CX3CL1 発現の低下が認められている。そこで、メチル水銀曝露に伴う運動機能障害発現過程において、神経細胞-ミクログリア間のネットワーク形成因子がどの時点から変動し始めるのかを明らかにすることを目的とし、運動野における CX3CL1 および CX3CR1 発現の経時的变化を免疫染色により評価した。まず、運動機能障害が顕在化するまでの大まかな時間軸における分子変動を把握するため、0、2、4、6、8 週の複数時点で脳組織を回収し、運動野における神経細胞由来の CX3CL1 およびミクログリア由来の CX3CR1 の発現変化を経時的に観察した。その結果、当初想定していた CX3CL1/CX3CR1 軸のバランス変化を明確に示す所見というよりも、両因子が同一の時期に低下しているように見える時点 (曝露 2 週目) が存在し、観察時点の間隔が広い条件下では、分子変動の時間的順序関係を適切に評価することが困難であった (Fig. 2A, B)。すなわち、観察時点の間隔が広い経時設計では、神経細胞側変動とミクログリア側変動が時間的に重なって観察される可能性があり、分子変動の時間的順序関係の評価に一定の制約が生じることが示唆された。

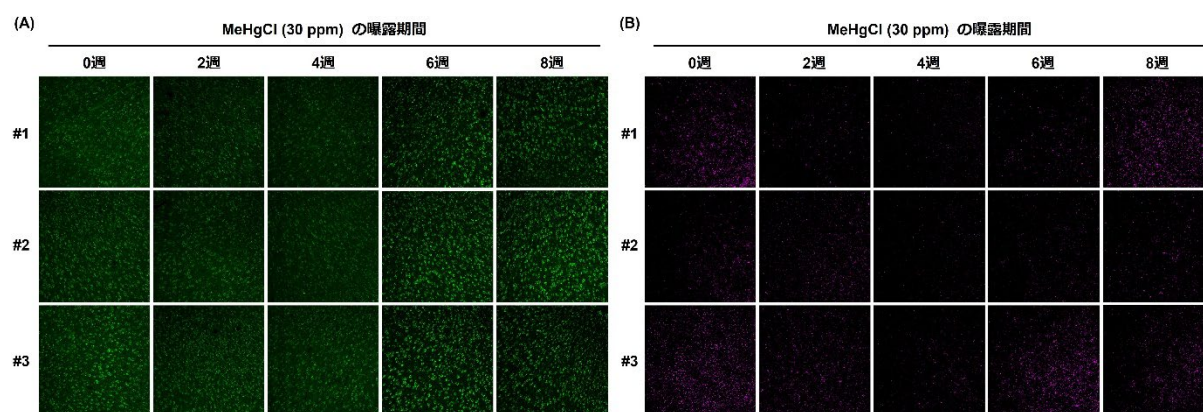


Fig. 2 マウス運動野における CX3CL1 および CX3CR1 発現の経時的变化 (メチル水銀曝露期間 0、2、4、6、8 週)

マウスに塩化メチル水銀 (30 ppm) を自由飲水により曝露し、各時点 (0、2、4、6、8 週) で回収した運動野において、(A) CX3CL1 (green) および (B) CX3CR1 (magenta) の発現を蛍光免疫染色により評価した。

そこで次に、時間的順序関係をより明確にするため、曝露初期 (0、1、2、3、4 週) に観察期間を絞り、週単位で観察時点を設定した追加検討を実施した。その結果、メチル水銀曝露マウスの運動野における CX3CL1 および CX3CR1 発現を経時的に観察したところ、神経細胞における CX3CL1 発現は曝露 1 週目から減少していたのに対し、ミクログリアにおける CX3CR1 発現は曝露 3 週目から減少傾向を示した (Fig. 3A, B)。すなわち、神経細胞での CX3CL1 発現変動がミクログリア側の CX3CR1 発現変化より時間的に先行することが判明した。CX3CL1/CX3CR1 シグナル系は神経細胞-ミクログリア間の相互作用を制御する代表的機構であることから、今回観察された CX3CL1 の発現減少は、メチル水銀曝露に伴う細胞間相互作用変化に関与する可能性が考えられる。

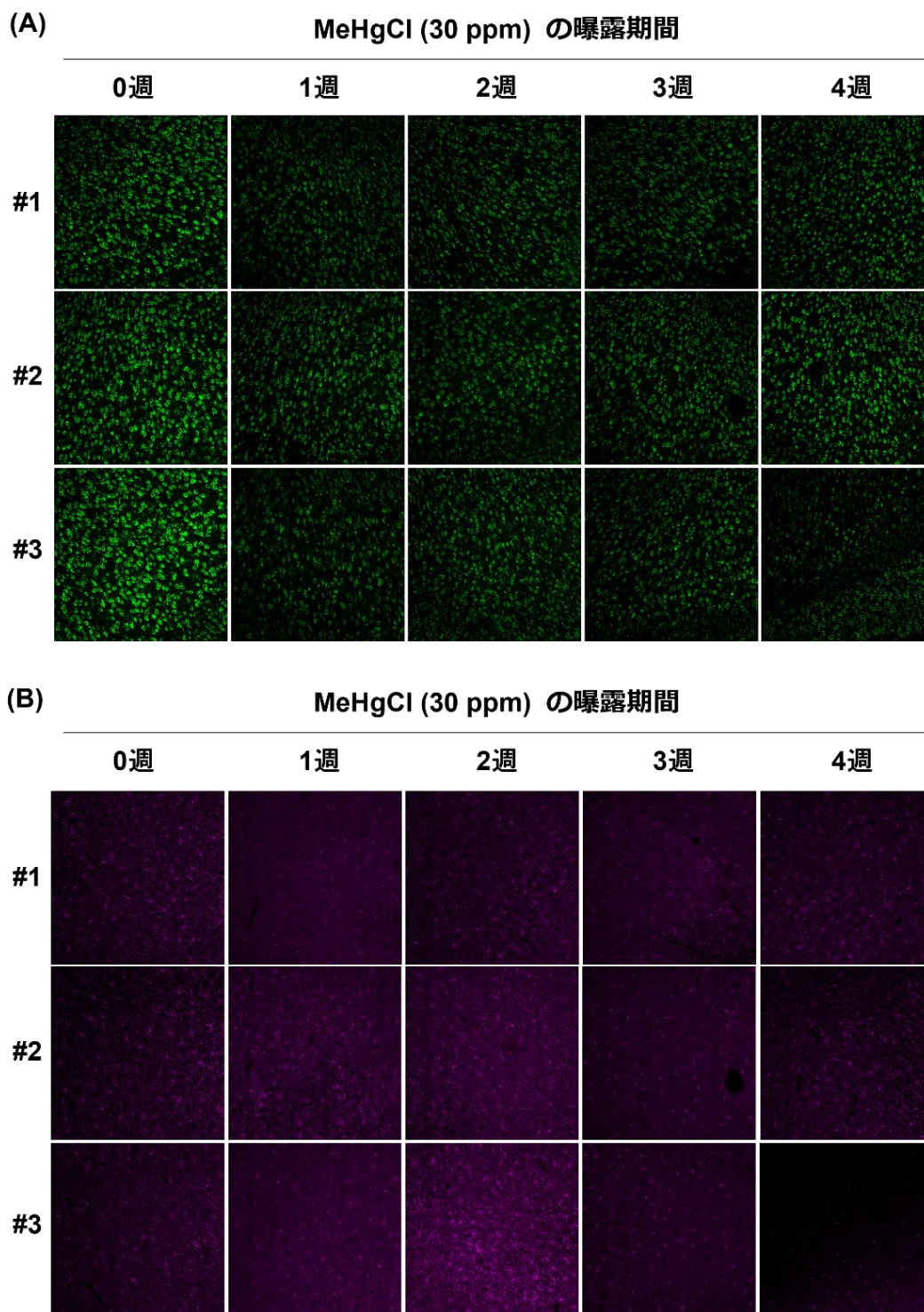


Fig. 3 マウス運動野におけるCX3CL1およびCX3CR1発現の経時的変化 (メチル水銀曝露期間0、1、2、3、4週)
マウスに塩化メチル水銀 (30 ppm) を自由飲水により曝露し、各時点 (0、1、2、3、4週) で回収した運動野において、(A) CX3CL1 (green) および (B) CX3CR1 (magenta) の発現を蛍光免疫染色により評価した。

3. メチル水銀曝露に伴うミクログリア活性化状態の評価

前項において、メチル水銀曝露マウスの運動野では神経細胞における CX3CL1 発現減少が曝露早期から観察され、その変動がミクログリア側の CX3CR1 発現変化に時間的に先行することが示唆された。そこで、これらネットワーク形成因子の発現変動とミクログリア活性化との関連性を検討するため、ミクログリア活性化指標である CD68 発現の経時的变化について評価を行った。その結果、メチル水銀曝露マウスの運動野において、CD68 陽性ミクログリアは曝露 2 週目から増加傾向を示した (Fig. 4)。特に、CX3CL1 の発現減少が観察された時期に続発する形で CD68 陽性細胞の増加が認められた。CD68 は貪食活性の亢進を伴うミクログリア活性化状態を反映することから、今回観察された CD68 の発現増加は、メチル水銀曝露に伴うミクログリア機能変化を示唆する所見と考えられる。さらに、今回得られた CX3CL1 の発現変動との時間的關係を踏まえると、神経細胞側のシグナル変化に続発してミクログリア活性化関連分子の変動が生じる可能性が示唆された。

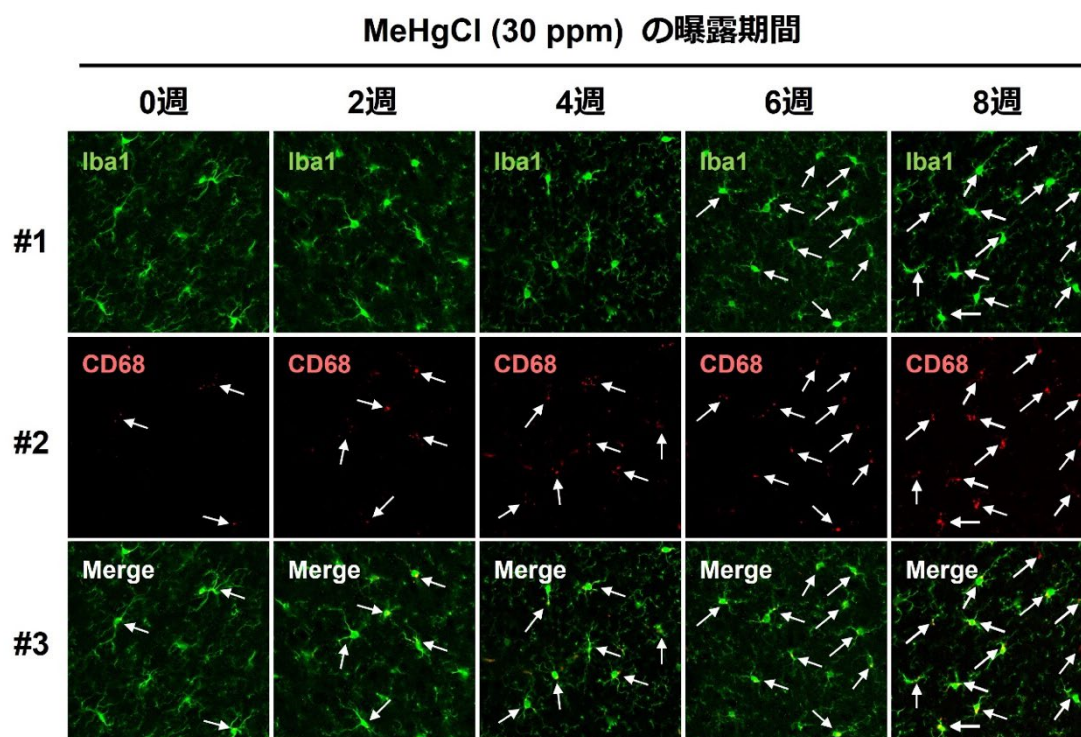


Fig. 4 メチル水銀曝露マウスの運動野における CD68 発現の経時的变化

マウスに塩化メチル水銀 (30 ppm) を自由飲水により曝露し、各時点 (0、1、2、3、4 週) で回収した運動野において、CD68 (red) および Iba1 (green) の発現を蛍光免疫染色により評価した。

4. モデル細胞株を用いたメチル水銀による CX3CL1 および CX3CR1 の発現変動解析

これまでに、マウス運動野においてメチル水銀曝露による CX3CL1 と CX3CR1 の経時的な発現減少が観察された。このことから、メチル水銀によるそれら蛋白質の発現減少機構を明らかにするため、モデル細胞株を用いた検討を行った。具体的には、脳神経細胞モデルとして C17.2 細胞

を、ミクログリアモデルとして BV2 細胞を用いて、メチル水銀が CX3CL1 および CX3CR1 の発現量に与える影響について解析した。BV2 細胞においては、メチル水銀により CX3CR1 mRNA 量の経時的な減少が認められた一方で、当該蛋白質量には明確な変動が認められなかった (Fig. 5A, B)。一方、C17.2 細胞においては、メチル水銀によりわずかに CX3CL1 mRNA の増加が認められたのに対し、当該蛋白質量は減少していた (Fig. 5C, D)。このことから、メチル水銀は C17.2 細胞において、CX3CL1 蛋白質の翻訳後修飾や安定性などに影響を与えることで、当該蛋白質の減少を引き起こす可能性があり、C17.2 細胞株は神経細胞のモデル細胞株として有用であることも示唆された。

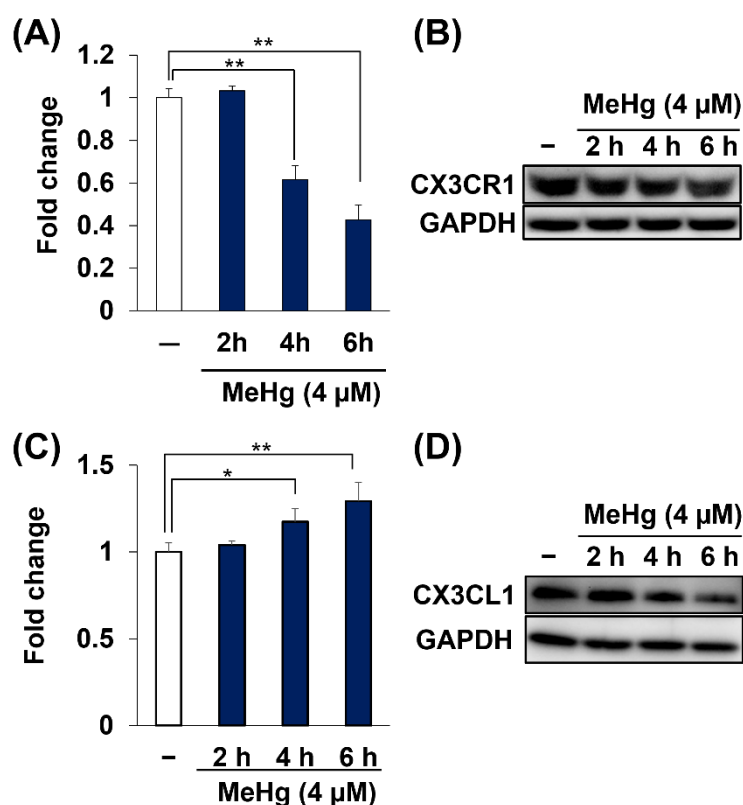


Fig. 5 モデル細胞株を用いたメチル水銀による CX3CL1 および CX3CR1 の発現変動解析
C17.2 細胞をメチル水銀で経時的に処理し、遺伝子発現量 (A) と蛋白質量 (B) をそれぞれ qPCR 法とウエスタンブロット法により解析した。BV2 細胞をメチル水銀で経時的に処理し、遺伝子発現量 (C) と蛋白質量 (D) をそれぞれ qPCR 法とウエスタンブロット法により解析した。

5. CX3CL1 および CX3CR1 の空間的局在関係の検討

CX3CL1/CX3CR1 シグナル系の機能的相互作用を形態学的観点から評価するため、運動野における CX3CL1 および CX3CR1 の空間的相互作用について免疫染色法を用いて検討した。本解析では共焦点レーザー顕微鏡を用いた Z 軸方向の連続撮影 (Z スキャン) を実施し、30 μm 厚の組織切

片に対してほぼ全層にわたる三次元的観察が可能となる。本観察条件下において CX3CL1 および CX3CR1 の形態を評価した結果、CX3CL1 陽性シグナルと CX3CR1 陽性シグナルは近接に存在する染色像が観察され、神経細胞側の CX3CL1 とミクログリア側の CX3CR1 が相互作用していることを支持する所見が得られた (Fig. 6)。一方で、両因子の相互作用を定量的に評価するためには、シグナル重複率の解析手法や解析領域設定、画像解析条件などの最適化が必要であると考えられる。

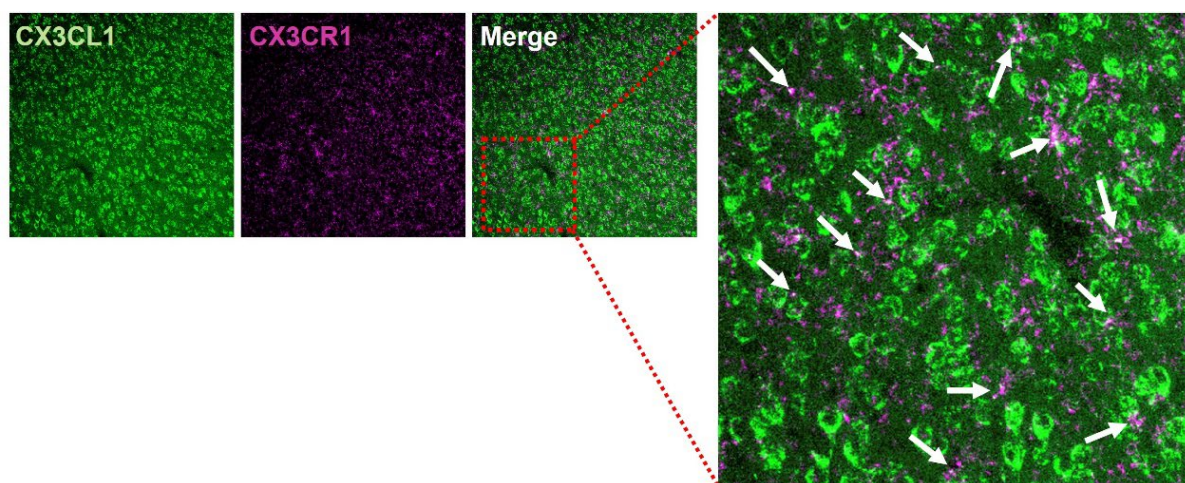


Fig. 6 マウス運動野における CX3CL1 および CX3CR1 の空間的局在解析

CX3CL1 および CX3CR1 の局在関係を免疫蛍光染色により評価した。30 μm 厚のマウス脳切片を用い、共焦点レーザー顕微鏡による Z 軸方向の連続撮影を実施し、組織全層にわたる三次元的観察を行った。

6. CD200 および CD200R 免疫染色条件の検討

今回は、CX3CL1/CX3CR1 シグナル系の他に神経細胞-ミクログリア間の制御機構として知られる CD200/CD200R シグナル系についても評価を試みた。CD200 および CD200R の組織内発現を免疫染色法により検討した結果、染色シグナルの検出感度および特異性の観点から評価に一定の制約が認められた。CD200/CD200R はともに膜蛋白質であり、抗体特性、抗原賦活条件、組織透過性などの影響を受けやすいことから、今回の検討では分子局在および発現変動を安定的に評価するまでは至らなかった。今後、CD200/CD200R シグナル系の精度の高い評価を行うためには、抗体選択、染色条件の最適化、ならびに解析条件の再検討を含む追加的検討が必要であると考えられる。

IV 考察

今年度の検討により、メチル水銀は神経細胞の細胞膜に存在する CX3CL1 の発現減少を介してミクログリア細胞膜上の CX3CR1 との相互作用を破綻させることでミクログリアを活性化し、本

作用が神経細胞傷害に関与している可能性を見出した。今後、メチル水銀による CX3CL1 の発現減少に関わる分子機構をモデル細胞や脳スライスを用いて解明することでメチル水銀によるミクログリアの活性化機構の全容が明らかになると期待される。一方、これまでの先行研究では、メチル水銀による脳神経障害は主に炎症性サイトカインの発現誘導に起因しており、本発現誘導には脳内免疫担当細胞であるミクログリアが関与することを報告している。しかし、今回の曝露条件下において、メチル水銀は炎症性サイトカインを発現誘導することなく、ミクログリアを活性化させることで脳神経障害を惹起していた。すなわち、メチル水銀はミクログリアの細胞障害因子 (活性酸素や興奮性アミノ酸、ATP など) の産生や、過度な貪食作用を誘導することで神経細胞やシナプ스에 損傷を与えている可能性が考えられる。

V 結論

本研究では、メチル水銀曝露に伴う中枢神経系変化について、神経細胞-ミクログリア間相互作用制御機構の観点から CX3CL1/CX3CR1 シグナル系について検討を行った。その結果、メチル水銀曝露マウスの運動野において、神経細胞の細胞膜上での CX3CL1 発現が早期から減少すること、ならびにミクログリアにおける CX3CR1 発現減少がこれに時間的に続発することが示唆された。さらに、CX3CL1 の発現減少に続く形で CD68 陽性ミクログリアの増加が観察され、神経細胞-ミクログリア間制御機構の変調とミクログリア活性状態変化との関連が示唆された。加えて、モデル細胞株を用いた検討により、メチル水銀による CX3CL1 の発現減少には、当該蛋白質の翻訳後修飾や安定性の低下が関与していることが示唆された。

VI 今後の課題

本研究により、メチル水銀曝露に伴う CX3CL1/CX3CR1 シグナル系の変動とミクログリア活性化状態との関連が示唆された一方、CX3CL1 発現減少の分子基盤ならびにその機能的意義については、さらなる検討が必要である。今後は、神経モデル細胞株を用いて、メチル水銀による CX3CL1 の発現減少に関わる分子機構の詳細な解析を進める。特に、CX3CL1 蛋白質量の変動に着目し、当該蛋白質の翻訳後修飾や安定性制御、細胞内輸送機構との関連について検討する。また、CX3CL1 蛋白質の細胞膜局在制御や細胞外ドメイン切断に関与する ADAM10 および ADAM17 の関与についても体系的な評価を行う。以上の検討により、CX3CL1 発現減少に関与する実行因子が特定できれば、当該因子の機能抑制がミクログリア活性化状態および神経細胞損傷に及ぼす影響をマウス脳スライス培養系または分化神経細胞-ミクログリア共培養系を用いて検討する。加えて、これまでに我々がメチル水銀毒性発現に関わることを報告したユビキチン・プロテアソーム系および MVB ソーティングシステムなどの蛋白質制御機構が CX3CL1 の発現制御に関与している可能性も十分に考えられることから、これら分子経路との関連性を含めた統合的解析を進める予定である。

本研究に関する現在までの研究状況、業績 (2020 年以降)

- 1) Yamashita N Nozuki H Yamashita T Tsubaki K Fukushima R Yamagata R Hwang GW. Methylmercury induces ferroptosis by suppressing GPX4 protein levels in C17.2 mouse neural stem cells. *J Toxicol Sci* 2026; 51: 101-109.
- 2) Yamagata R Fujishima M Shoji Y Yamashita N Nemoto W Hwang GW. Methylmercury causes pain disorders by disrupting the neuronal function of spinal dorsal horn neurons in mice. *Toxicol Res* 2025; <https://doi.org/10.1007/s43188-025-00330-y>
- 3) Yamashita N Yokoyama Y Kumagai A Fukushima R Yamagata R Hwang GW. SRXN1 is a novel protective factor against methylmercury-induced apoptosis in C17.2 mouse neural stem cells. *Toxicol Res* 2025; 41: 167-173.
- 4) Fukushima R Yamashita N Yadoya S Yamagata R Hwang GW. Knockdown of TXNIP attenuates methylmercury toxicity in mouse neuronal C17.2 cells. *Fundam Toxicol Sci* 2025; 12: 29-32.
- 5) Yamashita N Uchiyama M Yamagata R Hwang GW. Methylmercury induces apoptosis in mouse C17.2 neural stem cells through the induction of OSGIN1 expression by NRF2. *Int J Mol Sci* 2024; 25: 3886.
- 6) Yamagata R Saito A Fukushima R Nakagawasai O Yamashita N Tan-No K Hwang GW. Methylmercury exposure at dosage conditions that do not affect growth can impair memory in adolescent mice. *Toxicol Res* 2024; 40: 441-448.
- 7) Toyama T Xu S Hasegawa T Kanemitsu Y Noguchi T Lee JY Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Methylmercury directly modifies the 105th cysteine residue in oncostatin M to promote binding to tumor necrosis factor receptor 3 and inhibit cell growth. *Arch Toxicol* 2023; 97: 1887-1897.
- 8) Lee JY Kim JM Noguchi T Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Deubiquitinase USP54 attenuates methylmercury toxicity in human embryonic kidney 293 cells. *Fundam Toxicol Sci* 2022; 9: 159-162.
- 9) Toyama T Hoshi T Noguchi T Saito Y Matsuzawa A Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- α expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia. *Sci Rep* 2021; 11: 9832.
- 10) Kim JM Lee JY Kim MS Shindo S Kumagai T Naganuma A Hwang GW. Knockdown of deubiquitinating enzyme Usp34 confers resistance to methylmercury in HEK293 cells. *Fundam Toxicol Sci* 2021; 8: 157-160.
- 11) Toyama T Wang Y Kim MS Takahashi T Naganuma A Hwang GW. Increased expression of TCF3, transcription factor 3, is a defense response against methylmercury toxicity in mouse neuronal C17.2 cells. *Toxicol Res* 2021; 37: 451-458.
- 12) Sato M Toyama T Kim MS Lee JY Hoshi T Miura N Naganuma A Hwang GW. Increased putrescine levels due to ODC1 overexpression prevents mitochondrial dysfunction-related apoptosis induced by methylmercury. *Life Sci* 2020; 256: 118031.
- 13) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. *Environ Health Prev* 2020; 25: 30.
- 14) Toyama T Xu S Nakano R Hasegawa T Endo N Takahashi T Lee JY Naganuma A Hwang GW. The

nuclear protein HOXB13 enhances methylmercury toxicity by inducing oncostatin M and promoting its binding to TNFR3 in cultured cells. *Cells* 2020; 9: 45.

引用文献

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

英文要約 (Abstract)

Mechanism involved in motor dysfunction induced by methylmercury via disruption of the network between neurons and microglia

Gi-Wook Hwang

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University

Keywords: Methylmercury, Microglia, CX3CL1

We have previously demonstrated that methylmercury causes neurological impairment by excessively activating microglia using a mouse model with low microglial activity. Interestingly, methylmercury caused neurological impairment via microglial activation without inducing the expression of inflammatory cytokines. Furthermore, in the motor cortex where neuronal damage was observed, the expression of CX3CL1, an inhibitor of microglial activation, was decreased in neurons. CX3CL1 is selectively expressed in neurons and inhibits microglial activation by interacting with CX3CR1 present on the microglial membrane. Thus, methylmercury may activate microglia by disrupting the CX3CL1/CX3CR1 signal axis involved in the formation of networks between neurons and microglia, thereby causing further damage to neurons. Therefore, we examined the time-dependent changes in CX3CL1 and CX3CR1 expression in the motor cortex of methylmercury-exposed mice. CX3CL1 expression decreased from one week after exposure, whereas CX3CR1 expression showed a tendency to decrease from two to three weeks after exposure. Furthermore, microglia that were positive for CD68, an indicator of microglial activation, also showed a tendency to increase from two weeks after exposure. These findings suggest that methylmercury may activate microglia by decreasing CX3CL1 expression in neurons. Furthermore, in a study using C17.2 cells as a neuronal cell model, methylmercury reduced CX3CL1 protein levels without significantly affecting mRNA levels, suggesting that methylmercury may be involved in the reduction of CX3CL1 protein levels by affecting its post-translational modification or stability. Future studies using model cell lines and mouse brain slices to elucidate the mechanisms involved in the reduction of CX3CL1 expression by methylmercury are expected to reveal the mechanism of neurological impairment mediated by methylmercury-induced microglial activation.