

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16345

研究課題名(和文)メチル水銀によるミクログリア活性化を介した中枢神経傷害作用

研究課題名(英文)Methylmercury induced neuronal damage via M1-microglial activation

研究代表者

外山 喬士 (Toyama, Takashi)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50720918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミクログリアの活性を評価可能なマウス大脳皮質スライス培養を確立し、*in vivo*および培養細胞を組み合わせ、メチル水銀は、マウス脳内でミクログリアにおいて炎症性サイトカインであるTNF- α の発現を増加させることを見出した。また、ミクログリアから放出されたTNF- α は、神経細胞のTNFR1を介して神経細胞死を惹起することも明らかにした。また、メチル水銀によるミトコンドリアROS産生亢進を介したASK1/p38の活性化が、上記の誘導に関与することを突き止めた。以上は、中枢神経においてミクログリアと神経細胞のクロストークがメチル水銀による毒性発現に寄与することを新たに示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

4年前、約150カ国の国と地域が参加する水俣条約が発行されており、メチル水銀の健康影響は現在世界的なホットトピックとなっている。しかし、水俣病の発生から現在まで60年以上にわたりメチル水銀毒性発現機構の研究が行われてきたが、中枢特異的な神経傷害機構解明には至っていない。また、神経疾患におけるミクログリア活性化の関与は現在ホットな研究領域となっている一方、メチル水銀による神経傷害とミクログリア活性化の両者の関連を示す研究は無い。すなわち本申請研究が示した知見は、これらを具体的に、*in vitro*から*in vivo*で横断的に示しており、メチル水銀の毒性発現機構を解明する上で意義深い成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we newly established a mouse cerebral cortex slice culture that can evaluate inflammatory microglial activation. We also found that methylmercury induces inflammatory cytokine (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) in microglia in the mouse brain with the new methodology and *in vivo* experiments. Interestingly TNF- α is released out from microglia by methylmercury and induced neuronal cell death via TNFR1 on neurons. We further confirmed that methylmercury induced TNF- α induction is dependent on mitochondrial ROS production and activation of its downstream ASK1/p38 signaling. Hence the present study indicates inflammatory crosstalk between microglia and neurons are crucial for methylmercury-induced neuronal toxicity, and this could be an outstanding finding in the toxicology of methylmercury.

研究分野：分子毒性学

キーワード：メチル水銀 炎症性サイトカイン ミクログリア 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は自然循環の中で発生し、魚介類中に生物濃縮され、最終的に人体に蓄積する。本蓄積は中枢神経障害の原因となるため、世界的にそのリスクが問題視されているが、その機構は不明である。

これまで世界中が上記の解明を目指したが、脳には複数の細胞種が存在するにも関わらず、大半は培養神経細胞のみをモデルとした研究であった。つまり、脳内での細胞間クロストークは考慮されておらず、本点が中枢神経特異的なメチル水銀による神経傷害作用を解明する上での鍵となる可能性が考えられる。これまで申請者は、メチル水銀を投与したマウスの大脳皮質で神経細胞死が惹起されると同時に、炎症性サイトカインである TNF- α 、CD30L や TNFSF13C の発現が誘導されることを見出した (Iwai *et al.*, 2016. Scientific Report)。これらの誘導はメチル水銀が多く蓄積する肝臓や腎臓では認められなかったことから、脳選択的な作用であると考えられる。そこで、脳内でメチル水銀による炎症性サイトカイン類の発現誘導に関わる責任細胞を探索した結果、ミクログリアの同定に至った。炎症性サイトカイン類を発現誘導するミクログリアは“神経傷害性ミクログリア (活性化ミクログリア)”と呼ばれ、神経細胞死に関与することが示唆されている。実際に、メチル水銀でマウス由来ミクログリアを処理することによって上記の炎症性サイトカイン類の発現誘導が認められ、この際に用いた培養培地 (メチル水銀除去後) を回収して新鮮な培地と混合した培地でマウス神経細胞を培養するだけで細胞死が惹起されることも確認している。従って、メチル水銀によるミクログリアの活性化が中枢特異的な神経細胞死に寄与する可能性が強く考えられる。しかし、その実態は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、脳内の細胞間クロストークが維持されている大脳皮質スライス培養系 (後述) を用いて、メチル水銀による神経傷害へのミクログリア活性化の関与と、メチル水銀によるミクログリア活性化機構について、解明を目指した。

3. 研究の方法

3-1. 成熟ミクログリアの活性化を評価可能な大脳皮質スライス培養系の構築

これまで汎用されているプロトコルに従って作製したマウス大脳皮質スライス中のミクログリアはその 90%以上が未成熟であった。ミクログリアは生後 2 週間かけて脳内で成熟することが知られている。そこで、マウスの日齢を上げて大脳皮質スライスを試作したところ、スライス中ミクログリアの 70%程度まで成熟させることに成功した。そこでまず、大脳皮質スライス培養に用いるマウスの日齢条件や培地条件 (成熟促進因子の添加) 等を詳細に検討することで、ミクログリアの 90%以上が成熟した (成体マウスの脳内と同レベル) スライス培養系を構築する。なお、作製した大脳皮質スライスでのミクログリアの活性化能は、リポポリサッカライド (LPS; ミクログリア活性化剤) による TNF- α 、IL-1 β 、CD16、CD11b、CD32 などの活性化マーカーとなる遺伝子の発現誘導能を指標として評価した。

3-2. メチル水銀による神経傷害へのミクログリア活性化の関与

先ず、3-1 の培養系においてメチル水銀による神経細胞傷害とミクログリアの活性化を検討する。具体的に、メチル水銀による神経傷害は、神経細胞のマーカー蛋白質である NeuN の免疫

染色の減少で評価した。ミクログリアの活性化は 3-1 と同様の指標を qPCR により検討することで評価した。

3-3. メチル水銀によるミクログリアの活性化機構

これまで、ミクログリアの活性化には、NF- κ B 関連シグナルの活性化、MAP キナーゼの活性化、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生の増大、が関与することが示唆されている。そこで、および については、大脳皮質スライス中のミクログリアでのメチル水銀による NF- κ B の活性化と MAP キナーゼの活性化を免疫染色で検討した。一方、最近申請者はメチル水銀が心筋細胞においてミトコンドリアの分裂を促進することで活性酸素種 (ROS) の産生を増加させることを見出した。そこで、については、ミクログリアにおけるミトコンドリアからの活性酸素種の産生を Mito-Sox で染色することで検討した。

4. 研究成果

4-1. 成熟ミクログリアの活性化を評価可能な大脳皮質スライス培養系の構築

通常、大脳皮質のスライス培養には生後 7 日齢を使用するが、我々はマウスの日齢を生後 2 日目に変更することで、安定して LPS によるミクログリアの活性化を観測できる系を立ち上げた。スライスの厚さや、プレ培養期間、培養に使用するウシ・ウマ血清や、増殖因子等も検討したが、あまり影響はしなかった。これらの成果は新規実験系として、Hoshi T et al., Evaluation of M1-microglial activation by neurotoxic metals using optimized organotypic cerebral slice cultures. 2019, J Toxicol Sci. として報告した。

4-2. メチル水銀による神経傷害へのミクログリア活性化の関与

上記実験系の培養培地にメチル水銀を添加することで、ミクログリアの活性化、および神経細胞の減少が認められた。クロドロン酸内包リポソームやミノサイクリンでミクログリアを除去することで、メチル水銀による神経細胞の減少が抑制されたことから、メチル水銀によるミクログリアの活性化が神経細胞死の誘導に関与することが示唆された。以上の成果は、Hoshi T. et al., Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. 2020, Fundam Toxicol Sci. として報告した。

4-3. メチル水銀によるミクログリアの活性化機構

マウス培養ミクログリア (BV2) を用いて、メチル水銀による TNF- α の発現誘導に関わるシグナル伝達経路を検討したところ、NF- κ B および MAP キナーゼ (ERK、JNK および p38) の活性化が認められた。一方、BV2 でこれらのシグナルを各種阻害剤、または siRNA で阻害した結果、NF- κ B と p38 経路がメチル水銀による TNF- α の発現誘導に関わることが明らかとなった。p38 の活性化は、上流の ASK1 により制御されることが知られている。ASK1 は ROS により活性化することが知られており、メチル水銀による ROS が本シグナルを介した TNF- α の発現誘導に寄与すると考えた。メチル水銀によるミトコンドリアからの ROS 産生を Mito-TEMPO で消去した結果、予想通り p38 の活性化が抑制され、TNF- α の発現誘導も低下した。以上より、メチル水銀によるミトコンドリア ROS 産生の増加、およびその下流の ASK1/p38 シグナルがミクログリアの活性化 (TNF- α の発現誘導) に関与することが示された。また、メチル水銀による NF- κ B 活性化と ASK1/p38 シグナルを介した TNF- α 発現誘導はそれぞれ独立しているようであり、今後は、ミク

ログリアにおけるメチル水銀による TNF- α 発現誘導機構についての解明も試みる。以上の成果は、Toyama T. et al., Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- α expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia. Sci Rep. 2021. として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noguchi Takuya, Sekiguchi Yuto, Kudoh Yuki, Naganuma Rio, Kagi Tomohiro, Nishidate Akiko, Maeda Kazuhiro, Ishii Chizuru, Toyama Takashi, Hirata Yusuke, Hwang Gi-Wook, Matsuzawa Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Gefitinib initiates sterile inflammation by promoting IL-1 and HMGB1 release via two distinct mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03335-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyama Takashi, Wang Yanjiao, Kim Min-Seok, Takahashi Tsutomu, Naganuma Akira, Hwang Gi-Wook	4. 巻 -
2. 論文標題 Increased expression of TCF3, transcription factor 3, is a defense response against methylmercury toxicity in mouse neuronal C17.2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43188-021-00087-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Naoki, Toyama Takashi, Naganuma Akira, Saito Yoshiro, Hwang Gi-Wook	4. 巻 8
2. 論文標題 Hydrogen Peroxide Causes Cell Death via Increased Transcription of HOXB13 in Human Lung Epithelial A549 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxics	6. 最初と最後の頁 78 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxics8040078	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Masayuki, Toyama Takashi, Kim Min-Seok, Lee Jin-Yong, Hoshi Takayuki, Miura Nobuhiko, Naganuma Akira, Hwang Gi-Wook	4. 巻 256
2. 論文標題 Increased putrescine levels due to ODC1 overexpression prevents mitochondrial dysfunction-related apoptosis induced by methylmercury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118031 ~ 118031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118031	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyama Takashi, Hoshi Takayuki, Noguchi Takuya, Saito Yoshiro, Matsuzawa Atsushi, Naganuma Akira, Hwang Gi-Wook	4. 巻 11
2. 論文標題 Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89210-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takayuki Hoshi, Takashi Toyama, Youichi Shinozaki, Schuichi Koizumi, Jin-Yong Lee, Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang	4. 巻 44
2. 論文標題 Evaluation of M1-microglial activation by neurotoxic metals using optimized organotypic cerebral slice cultures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 471-479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takayuki Hoshi, Takashi Toyama, Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang	4. 巻 6
2. 論文標題 Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 167-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.6.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takashi Toyama
2. 発表標題 Redox Regulation of Microglial Activation by Methylmercury
3. 学会等名 Gordon Research Conference Oxygen Radicals (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Hoshi, Takashi Toyama, Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang
2. 発表標題 Establishment of organotypic brain slice culture that can evaluate M1-microglial activation
3. 学会等名 フォーラム2019衛生薬学・環境トキシコロジー（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外山 喬士
2. 発表標題 メチル水銀の炎症性サイトカイン類の発現誘導を介した脳神経傷害機構
3. 学会等名 フォーラム2020 環境・衛生トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関