

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07077

研究課題名（和文）メチル水銀による神経/筋機能障害に対する神経軸索/筋線維再生治療の実験的研究

研究課題名（英文）Experimental research on regenerative treatment of axon and muscle fiber for nerve and muscle dysfunction by methylmercury

研究代表者

藤村 成剛（Fujimura, Masatake）

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・部長

研究者番号：20416564

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）：令和元年度までの研究によって、当初の目的である神経機能障害および筋機能障害の治療についてはROCK阻害剤および振動刺激処置が有用であることを明らかにした。そして、令和2年度からメチル水銀曝露によって引き起こされる神経障害性疼痛についての研究を開始した。令和3年度にメチル水銀による神経障害性疼痛モデルを作成することに成功し、令和4年度に本モデルを用いてROCK阻害剤であるFasudilが神経障害性疼痛を抑制することを明らかにした。さらに、令和5年度は、ガバペンチン（一般的な神経障害性疼痛に対して臨床使用されている）が本モデルにおいて神経障害性疼痛を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義や社会的意義目的は、水俣病を代表とするメチル水銀中毒において引き起こされる神経機能障害および筋機能障害の治療を可能にするために、メチル水銀中毒動物モデルを用いてその発症メカニズムを実験的に明らかにし、さらにその発症メカニズムに基づいた薬剤等による治療効果を実験的に明らかにすることによってメチル水銀中毒の治療についての有益な情報を得ることである。

研究成果の概要（英文）：Research conducted up to FY2028 revealed that ROCK inhibitors and vibration stimulation were effective in the treatment of neurofunctional disorders and muscle dysfunction, which was the initial goal of the project. Then, research on neuropathic pain caused by methylmercury exposure was initiated in FY2021. In FY2021, we succeeded in creating a neuropathic pain model induced by methylmercury, and in FY2022, we used this model to demonstrate that the ROCK inhibitor Fasudil suppressed neuropathic pain. Furthermore, in FY2023, we demonstrated that gabapentin (which is clinically used for general neuropathic pain) suppressed neuropathic pain in this model.

研究分野：神経毒性学

キーワード：メチル水銀 神経機能障害 筋機能障害 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

通常、毒性物質は生体に存在する脳血液関門によって脳神経系に侵入できないが、メチル水銀は脳血液関門を通過し神経細胞を傷害する。神経細胞以外の細胞は増殖能を有するために一部が細胞死に至っても生き残った細胞による自己増殖によって再生できるが、神経細胞は増殖能を有しないためにその神経機能障害は不可逆的かつ重篤になる。

メチル水銀中毒に対する対処法としては、急性期における増悪予防処置が実施されたことがある。メチル水銀を体内から排泄させるキレート剤またはメチル水銀によって引き起こされた酸化ストレスを抑制する酸化防止剤である。これらの急性期処置は、その予防的効果によりそれ以上の病態増悪には一定の効果が確認されているが、現在、急性期患者はほぼ存在せず、問題になっているのは慢性期患者における神経障害である。上記のように神経機能障害は急性期にその発症/進展因子を抑制することによってそれ以上の増悪を抑制することは可能であるが、急性期を過ぎてしまうと発症/進展因子の抑制による神経障害の根本治療は困難である。勿論、リハビリテーション処置によってある程度症状改善は認められているが、これまで薬物等による慢性期の神経機能障害（運動機能低下、感覚障害、しびれ等）に対する根本治療の試みは殆ど行われていない。さらに、現代では特定の細胞をiPS細胞によって作成する再生医療研究が注目されている。しかしながら、メチル水銀中毒においては多種多様な神経細胞が広範囲に傷害されるため、iPS細胞による再生医療は非常に困難であることが否めない。

それでは、慢性期のメチル水銀中毒における神経機能障害に対する根本的な治療法はないのであろうか？

神経細胞は通常の細胞とは異なり、細胞本体以外に神経軸索および樹状突起を有し、情報伝達部位（シナプス）を形成している。水俣病において短期間で死に至る劇症型患者の場合、大量のメチル水銀によって直接的に神経細胞死（神経細胞体自体の死滅）を生じさせたと考えられるが、比較的メチル水銀の摂取量が少なかったと考えられる慢性期患者の場合、神経機能に重要な役割を果たす神経軸索に特異的な傷害が生じ（図1）、神経細胞死に至っていても情報伝達の不全による神経機能障害が起こっていることが水俣病患者剖検例の脊髄末梢神経系において示されている。よって、神経軸索が傷害を受けていたとしても、細胞体さえ残存していれば、傷害された神経軸索を再び伸展（再生）させて神経伝達を正常化することによって神経機能が回復する可能性がある。神経軸索を再び伸展（再生）させるには、神経軸索の収縮およびマイクログリアにおける軸索変性因子の産生に関与するROCK経路を抑制すること（ROCK阻害剤）が有効だと考えられる。本仮説を基礎研究において立証することによって、臨床研究に繋げることができると考える。

一方、メチル水銀による直接的および神経機能障害に起因する長期的な筋肉の不使用によって、下肢に筋機能障害（筋緊張、疼痛および廃用性筋萎縮等）が生じることが知られている。この障害は神経機能改善のためのリハビリテーション処置を行う際の妨げになっている。筋機能障害の改善方法としては、足底部への振動刺激処置が有効であることを私たちのこれまでの研究によって確認している（Usuki and Tohyama, Occupational therapy intervention to inspire self-efficacy in a patient with spinal ataxia and visual disturbance. MJB Case Rep., 2015）。しかしながら、本研究は臨床研究であるためその詳細な作用メカニズムについては明らかになっていない（患者の組織を用いて組織学的、生化学的研究を行うことは不可能）。実際の神経機能回復にはリハビリテーション処置の補助的適用が必須であることから、実験動物を用いた振動刺激の詳細な作用メカニズム解明も臨床研究から基礎研究へのアプローチとして重要であると考えられる。

2. 研究の目的

未だ解決されていないメチル水銀による神経機能障害の根本治療を可能にするために、神経軸索の再生メカニズムに着目したROCK阻害剤による薬物治療の可能性について実験的に明らかにし、臨床研究へ繋げる（基礎研究から臨床研究へのアプローチ）ことを目的とする。さらに、神経機能障害に伴う筋機能障害については、これまで臨床研究によって振動刺激が有効であることが示されているが、そのメカニズムについては十分に解明されていないことから、実験動物を用いて振動刺激の筋機能障害に対する作用メカニズムを理論的に明らかにし、臨床研究へ還元する（臨床研究から基礎研究へのアプローチ）ことも目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の研究項目を段階的に実施し、メチル水銀による神経および筋機能障害に対するROCK阻害剤および振動刺激処置の治療効果およびその再生治療メカニズムを明らかにする。

[メチル水銀中毒モデルにおける神経機能障害に対するROCK阻害剤の治療メカニズムの解明]

実験動物（ラット）にメチル水銀水を投与（既に確立している 20 ppm メチル水銀水の 3週間飲水投与）することによって神経機能障害を発現させる。この神経機能障害とは慢性期のメチル水銀中毒患者で観察される神経機能障害（運動機能低下，感覚障害，しびれ等）の指標になりうる後肢交差症状および運動量減少である。メチル水銀曝露終了後、脳神経系へ移行するROCK阻害薬（Fasudil）を 6週間持続投与して上記の神経機能障害およびその責任病巣である脊髄末梢神経系の神経軸索変性に対する効果について解析を行う。なお、ROCK阻害剤が上記の障害に対して治療効果を示すことは、既に予備実験において確認済である（Fujimura and Usuki, Recovery effect of a ROCK inhibitor, Fasudil, on axonal degeneration of dorsal spinal nerve root in methylmercury-intoxicated rats. 57th Society of Toxicology, 2018）。また、脊髄末梢神経から蛋白質を抽出し、メチル水銀およびROCK阻害剤による蛋白質発現の変動（特に神経由来の軸索形成因子とマイクログリア由来の炎症因子等に着目）について解析を行い、ROCK阻害剤の神経機能障害に対する再生治療メカニズムを明らかにする。なお、予備実験において、メチル水銀による神経軸索形成因子（GAP43等）の発現低下およびマイクログリア活性化を介した炎症因子（神経軸索変性に作用する TNF α , IL1- β 等）の産生をROCK阻害剤が抑制することを見出しており、既に変動蛋白質の絞り込みは進んでいる。

[メチル水銀中毒モデルにおける筋機能障害に対する振動刺激処置の治療メカニズムの解明]

前項目と同様に実験動物（ラット）にメチル水銀水を与えることによってラット下肢に筋機能障害を発現させる。この筋機能障害は筋緊張，疼痛およびヒラメ筋に特異的な筋萎縮（筋線維変性）である。メチル水銀曝露終了後、足底部に 2週間の振動刺激処置を行い、筋機能障害および筋萎縮（筋線維変性）について解析を行う。なお、振動刺激処置が上記の障害に対して治療効果を示すことは、既に予備実験において確認済である（藤村ら，メチル水銀による神経・筋機能障害に対する神経・筋線維の再生治療に関する実験的研究．メタルバイオサイエンス研究会 2018）。また、下肢の筋組織から蛋白質を抽出し、メチル水銀および振動刺激処置による蛋白質発現の変動（特に筋繊維形成に影響する成長因子等に着目）について解析を行い、振動刺激処置の筋機能障害に対する再生治療メカニズムを明らかにする。なお、予備実験において、メチル水銀による筋線維成長因子（Mechano growth factor等）の産生低下に対して振動刺激処置がその産生を正常化することを見出しており、既に変動蛋白質の絞り込みは進んでいる。

[培養細胞を用いた神経機能障害および筋機能障害の原因候補蛋白質の機能解析]

これまでの検討によって絞り込まれたメチル水銀および治療処置によって変動する蛋白質の機能を明確にするために、発現ベクターおよび siRNA を用いて、標的蛋白質を培養神経細胞，マイクログリア細胞および筋細胞で変動させて、メチル水銀による神経軸索変性，サイトカイン産生能および筋線維変性におよぼす機能を検証する。

4．研究成果

初年度（令和元年度）は、メチル水銀中毒動物モデルを用いた実験によって、ROCK 阻害剤および振動刺激処置が組織病理学的に神経軸索および筋線維の再生を促し、さらにはその詳細なメカニズムについて実験的に明らかにした。これらの結果に関しては 2 報の学会発表を行い、さらに 2 報の論文としてまとめ、国際学術雑誌における出版を達成した。そしてその後、令和 2 年度からメチル水銀曝露によって引き起こされる神経障害性疼痛についての研究を開始した。令和 3 年度は、メチル水銀中毒動物モデルにおいて下肢に神経障害性疼痛（疼痛閾値の低下および痛覚過敏）が生じていることを発見し、さらに、その詳細なメカニズムについて実験的に明らかにすることに成功した。これらの結果に関しては 2 報の学会発表、さらに 1 報の論文および 1 報の総説としてまとめ、国際学術雑誌における出版を達成した。令和 4 年度は、前年度に作成に成功したメチル水銀曝露によって神経障害性疼痛が生じるモデルラットを用いて、ROCK 阻害剤である Fasudil がメチル水銀曝露によって発症する神経障害性疼痛を抑制することを見出し、さらに、その抑制メカニズムが、脊髄後角におけるメチル水銀による炎症性サイトカインの発現増加と非炎症性サイトカインの発現低下に対して Fasudil が抑制するためであることを明らかにした。これらの結果に関しては 1 報の論文および 1 報の総説としてまとめ、国際学術雑誌における出版を達成した。さらに最終年度である令和 5 年度は、本メチル水銀中毒モデルにおける神経障害性疼痛に対するガバペンチン（神経障害性疼痛に対して臨床使用されている）の効果について確認し、さらに、その抑制メカニズムが、大脳皮質体性感覚野における感覚/痛覚神経複合体形成を抑制するためであることを明らかにした。本結果に関しても 1 報の論文としてまとめ、国際学術雑誌における出版を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujimura M	4. 巻 371
2. 論文標題 Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents neuropathic pain in Minamata disease model rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicol. Lett.	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2022.10.001.	査読の有無 有
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 Fujimura M, Usuki F	4. 巻 23
2. 論文標題 Cellular conditions responsible for methylmercury-mediated neurotoxicity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 7218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23137218.	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 Fujimura M, Usuki F, Nakamura A	4. 巻 95
2. 論文標題 Methylmercury induces hyperalgesia/allodynia through spinal cord dorsal horn neuronal activation and subsequent somatosensory cortical circuit formation in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 2151-2162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-021-03047-7	査読の有無 有
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 Usuki F, Fujimura M, Nakamura A, Nakano J, Okita M, Higuchi I	4. 巻 10
2. 論文標題 Local Vibration Stimuli Induce Mechanical Stress-Induced Factors and Facilitate Recovery From Immobilization-Induced Oxidative Myofiber Atrophy in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Physiol.	6. 最初と最後の頁 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2019.00759	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 Fujimura M, Usuki F, Nakamura A	4. 巻 168
2. 論文標題 Fasudil, a Rho-Associated Coiled Coil-Forming Protein Kinase Inhibitor, Recovers Methylmercury-Induced Axonal Degeneration by Changing Microglial Phenotype in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 126-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfy281	査読の有無 有
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 Fujimura M	4. 巻 29
2. 論文標題 Gabapentin improves neuropathic pain in Minamata disease model rats.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Environ. Health Prev. Med.	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1265/ehpm.24-00035	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤村成剛, 臼杵扶佐子, 中村篤
2. 発表標題 メチル水銀曝露はラット足底部に神経障害性疼痛の1種である疼痛閾値低下 (アロディニア) を引き起こす
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujimura M, Usuki F, Nakamura A
2. 発表標題 Methylmercury induces allodynia through activation of inflammatory microglia in spinal cord and subsequent stimulation in somatosensory cortex of rats
3. 学会等名 60th Annual Meeting, Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujimura M, Usuki F, Nakamura A
2. 発表標題 Fasudil, a ROCK inhibitor, recovers methylmercury-induced axonal degeneration by changing microglial phenotype in rats
3. 学会等名 14th International Conference on Mercury as a Global Pollutant (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤村成剛, 白杵扶佐子, 中村篤, 中野治郎, 沖田実, 樋口逸郎
2. 発表標題 局所振動刺激はラットにおいてメカノストレス因子を誘導し不動化による筋萎縮からの回復を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fujimura M, Usuki F	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 16
3. 書名 Handbook of Neurotoxicity	

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立水俣病総合研究センター/ 職員紹介/ 藤村成剛 http://nimd.env.go.jp/about/organization/member04.html
--

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
研究分担者	中村 篤 (Nakamura Atsushi) (40785713)	国立水俣病総合研究センター・その他部局等・医療系職員 (87401)	
研究分担者	臼杵 扶佐子 (Usuki Fusako) (50185013)	鹿児島大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・客員 研究員 (17701)	

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