

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19417

研究課題名(和文)メチル水銀はなぜ運動神経よりも感覚神経に強い毒性を発現するのか？

研究課題名(英文)Methylmercury-induced specific cytotoxicity in sensory nerves.

研究代表者

吉田 映子(Yoshida, Eiko)

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・主任研究員

研究者番号：50735488

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)：メチル水銀中毒の初期に四肢末端のしびれ感が生じる。水俣病患者の病理組織学的に重要な点として、運動神経(AHC)は傷害がなく、感覚神経(DRG)のみ顕著に傷害されること、その傷害は軸索変性が先行しており髄鞘(シュワン細胞)には変化が見られないことが報告されているが、感覚神経のみが傷害される分子機構に関して未解明な点が多い。本研究はDRG、AHCおよびシュワン細胞の比較において、メチル水銀によるDRG特異的な傷害がメチル水銀の細胞内蓄積量に依存すること、そのメカニズムとしてメチル水銀輸送体の発現量の観点から検討した結果、DRGがメチル水銀を蓄積しやすい特性を有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

従前より、重篤なメチル水銀中毒の水俣病患者がハンター・ラッセル症候群といわれる中枢神経障害を主徴とすることから、メチル水銀毒性の基礎研究の多くはこの中枢神経障害を中心として展開・議論されてきた。しかしながら、メチル水銀中毒の初期段階で認められる感覚神経優位な傷害についての議論は事実上置き去りになっている。特に今後の課題は大型魚類の摂取、つまりは食生活による微量なメチル水銀の摂取が長期に渡って人体へ蓄積した場合の影響を考慮することであり、メチル水銀中毒の初期症状として現れる手足の痺れなどの感覚障害の発症機序を理解することが重要であると言えよう。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury (MeHg) exhibits neurotoxicity and caused Minamata disease. Sensory neuron is highly susceptible to MeHg. In this study, we found that the dorsal root ganglion (DRG) were much more sensitive to MeHg than anterior horn cells and Schwann cells. Among these cell types, MeHg most highly accumulated in DRG. The constitutive expression level of LAT-1 was higher and that of MRP-2 was lower in DRG. These results suggest that the susceptibility of DRG to MeHg is due to the constitutive expression levels of LAT-1 and MRP-2, which enables MeHg to accumulate highly within the cells.

研究分野：分子毒性学

キーワード：メチル水銀 末梢神経障害 感覚神経 後根神経節細胞(DRG)

1. 研究開始当初の背景

水俣病の初期症状として出現する四肢末端の痺れなどの感覚障害は、中枢性病変によるものと、脊髄末梢感覚神経病変によるものが考えられている。重篤なメチル水銀中毒の水俣病がハンター・ラッセル症候群といわれる中枢神経障害を主徴とすることから、メチル水銀毒性の基礎研究の多くはこの中枢神経障害説のもとに展開され、中枢神経を対象にメチル水銀の毒性発現機構に関する分子細胞毒性学的研究が行われてきた。しかしながら、これらの研究は総じて「メチル水銀はなぜ中枢神経毒なのか」という問いに答えようとするものであり、メチル水銀中毒症状で認められる末梢神経病変、特に感覚神経優位な傷害についての議論は置き去りになっている。

末梢神経は感覚神経や運動神経の軸索をシュワン細胞(髄鞘)が覆っている。水俣病の末梢神経病変に関して病理組織学的に興味深い点として、運動神経や髄鞘と比較し感覚神経に局限した軸索変性(細胞傷害に由来する軸索の変性・消失)が生じることが挙げられる(*Toxicol. Pathol.*, **29**:565-573, 2001)。この現象に関し、感覚神経におけるメチル水銀毒性を示した例はあるが(*NeuroToxicol.*, **24**:369-378, 2003)、末梢神経の細胞種ごとにメチル水銀毒性を検討した例は少なく、この分子機構に関する有力な知見もない。

2. 研究の目的

本研究は「メチル水銀による感覚神経優位な傷害」が生じるという病理組織学的な知見に対応する分子機構を二つの仮説に基づき解明することである。これまで末梢神経を構成する細胞種ごとにメチル水銀毒性を検討した例が少ないことから、本研究では末梢神経の細胞種ごとのメチル水銀に対する感受性を比較検討し、その毒性発現機構を解明することで、感覚神経のメチル水銀高感受性を決定づける因子について明らかにする。

3. 研究の方法

ラット感覚神経(脊髄後根神経節細胞: DRG)および運動神経(前角神経細胞: AHC)は、Wistar Rat (3~4週齢・オス)の胸椎から仙椎を摘出し、各神経細胞を分離して得た。神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し、DRGは7日間、AHCは14日間、10% FBS-DMEMにて培養した後、実験に使用した。シュワン細胞はScienCell Research Labより購入した。メチル水銀は1% BSA-DMEMを用いて0.25, 0.5, 1, 3および5 μ Mに調製し曝露した。

細胞の傷害性は形態学的観察およびCell Counting kit-8、アポトーシスはTUNEL染色法、遺伝子の発現はReal-time RT-PCR法、タンパク質の発現はウエスタンブロット法にて評価した。LAT-1選択的阻害剤はJPH203を処理した。LAT-1 siRNAはThermo Fisher社Silencer® Select siRNAsより購入しリポフェクション法にて細胞に導入した。各神経細胞への水銀量の蓄積は、灰化(140度にて30分間処理)したサンプルに金を添加し、金アマルガムとしてICP質量分析装置にて水銀量を測定した(測定する際は存在する全ての水銀同位体元素を測定)。

4. 研究成果

(1) 末梢神経を構成する神経細胞のメチル水銀感受性評価と毒性発現機構の解明

DRG, AHC およびシュワン細胞にメチル水銀を曝露すると, DRG においてのみ濃度依存的な細胞傷害が惹起され, メチル水銀の濃度依存的なアポトーシス性細胞死の増大が観察された。このとき細胞内水銀蓄積量 (^{202}Hg) は AHC やシュワン細胞に比べ, DRG において顕著に増大していた。次に, メチル水銀を細胞内に輸送する LAT-1 および細胞外への排泄に関わる MRP-2 の発現を検討したところ, LAT-1 の構成的発現は, AHC やシュワン細胞と比較し DRG で高かった。また, いずれの細胞においても LAT-1 の発現はメチル水銀の影響を受けなかった。そこで, LAT-1 選択的阻害剤 JPH203 または LAT-1 siRNA を処理した DRG にメチル水銀を曝露したところ, メチル水銀による細胞傷害が軽減された。一方, MRP-2 の構成的発現は DRG では特に AHC と比較して低く, さらにメチル水銀による MRP-2 の誘導は AHC においてのみ認められた。

以上より, メチル水銀による感覚神経特異的な毒性発現機構の一つとして, DRG におけるメチル水銀の蓄積量の増大に伴うアポトーシスの誘導, そしてこれは DRG における構成的発現が LAT-1 では高く MRP-2 では低いことに起因すると考えられた。

(2) 炎症性サイトカインによる感覚神経優位な細胞毒性とその分子機構

先行研究において, メチル水銀中毒症状 (後肢交差) を示すラット DRG がどのようなシグナルカスケードが影響を受けているか解析を行ったところ, 腫瘍壊死因子 (TNF) シグナル経路および Toll 様受容体 (TLR) シグナル経路に関連した遺伝子群が多く含まれることを報告した (*J. Toxicol. Sci.*, **44**(8):549-558, 2019)。

これらの結果から, ラット初代神経細胞培養系の DRG を用いて, 特に TNF シグナル経路について検討を行った。メチル水銀を処理した DRG においてアポトーシス誘導に関わる受容体である TNF 受容体 1 遺伝子が誘導されたが, TNF 受容体 2 の遺伝子発現には影響しなかった。また, TNF 受容体 1 の下流シグナルである Caspase8 および Caspase3 遺伝子の発現が誘導された。これらの遺伝子発現誘導は AHC やシュワン細胞では認められなかった。さらにメチル水銀を処理した DRG における TNF 受容体 1 のタンパク質の発現, Caspase8 および Caspase3 の断片化について検討した結果, メチル水銀処理後 12 時間において, メチル水銀曝露濃度依存的な TNF 受容体 1 の発現上昇, cleaved Caspase8 および cleaved Caspase3 が増加した。さらに遺伝子レベルにおける検討と相関して Caspase8 と Caspase3 の pro 体の発現もメチル水銀により上昇した。ここで, DRG においてのみメチル水銀により TNF 受容体 1 の発現が上昇したことから, 各神経細胞における TNF- α (5, 10, 20 および 50 ng/mL) に対する感受性を評価したところ, DRG, AHC およびシュワン細胞, いずれの細胞においても TNF- α による傷害は認められなかった。さらに, メチル水銀と TNF- α を同時に処理しても TNF- α の効果は認められず, メチル水銀のみを処理した細胞と比較して顕著な差は認められなかった。

このことからメチル水銀による感覚神経優位な傷害は, DRG においてメチル水銀が TNF シグナル経路を活性化し細胞死を誘導することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinoda Yo, Tatsumi Satoshi, Yoshida Eiko, Takahashi Tsutomu, Eto Komyo, Kaji Toshiyuki, Fujiwara Yasuyuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 549 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.549	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 Shinoda Yo, Ehara Shunsuke, Tatsumi Satoshi, Yoshida Eiko, Takahashi Tsutomu, Eto Komyo, Kaji Toshiyuki, Fujiwara Yasuyuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Methylmercury-induced neural degeneration in rat dorsal root ganglion is associated with the accumulation of microglia/macrophages and the proliferation of Schwann cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 191 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.191	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 Shinoda Yo, Yamada Yuta, Yoshida Eiko, Takahashi Tsutomu, Tsuneoka Yayoi, Eto Komyo, Kaji Toshiyuki, Fujiwara Yasuyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Hypoalgesia and recovery in methylmercury-exposed rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 303 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.303	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 Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu, Yoshida Eiko, Ding Yunjie, Yamakawa Hiroto, Shinkai Yasuhiro, Ishii Isao, Kumagai Yoshito	4. 巻 330
2. 論文標題 Repression of mercury accumulation and adverse effects of methylmercury exposure is mediated by cystathionine γ -lyase to produce reactive sulfur species in mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 128 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2020.05.007	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 Abiko Yumi, Yoshida Eiko, Kumagai Yoshito	4. 巻 9
2. 論文標題 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase converts methylmercury to its sulfur adduct with lowered toxicity through sulfane sulfur atoms on Cys247	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.9.1	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 青木一浩, 吉田映子, 篠田陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 培養ラット後根神経節細胞に特異的なメチル水銀毒性の要因となる輸送体LAT-1およびMRP-2
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会, 2020年6月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片見文香, 吉田映子, 篠田陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 メチル水銀の神経毒性におけるTNF- α の役割
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会, 2020年6月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木一浩, 吉田映子, 篠田陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 メチル水銀の感覚神経特異的な毒性発現に関与する輸送体LAT-1およびMRP-2
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー . 2020年9月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片見文香, 吉田映子, 篠田陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 メチル水銀の神経毒性に対するTNF- α の関与
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2020年9月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田映子, 青木一浩, 篠田 陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 メチル水銀による培養ラット後根神経節細胞に特異的な傷害とその分子機構
3. 学会等名 第46回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田映子, 青木一浩, 篠田 陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 メチル水銀がラット後根神経節細胞に特異的な傷害を引き起こす分子メカニズム
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木一浩, 吉田映子, 篠田 陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 培養ラット後根神経節細胞に特異的なメチル水銀の毒性を担うLAT-1
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片見文香, 吉田映子, 篠田 陽, 藤原泰之, 鍛冶利幸
2. 発表標題 TNF- 欠損マウスにおけるメチル水銀の毒性
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/e-yoshida
--

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
---------	---------