

学位論文題名

有機水銀による選択的小脳顆粒細胞死の発症機構

学位論文内容の要旨

緒言

ヒト有機水銀中毒症である水俣病では大脳視覚皮質と感覚野、小脳顆粒細胞層、末梢感覚神経が選択的に障害されることが報告されている。ラットに有機水銀を投与すると小脳顆粒細胞に選択的細胞死が生じ、ヒト有機水銀中毒症での小脳顆粒細胞死の発症機構を解析する上で適当なモデルである。小脳顆粒細胞変性に関する研究の多くは生後初期の小脳を用いた培養細胞系でなされているが、神経細胞の生死はシナプスを介したネットワークに依存しており、この発症機構を解明するためには *in vivo* での解析が重要と考えられる。そこで、動物による種差、系による差異を検討したのち、最も感受性の強い系を選び形態学的検討を行って、細胞死の形態学的特徴を検索した。次いで小脳顆粒層細胞にのみ発現している遺伝子 *Zic1* について、さらにアポトーシスに関連している種々の分子に関する発現の変化を調べ、最後に発症直前に採取した mRNA の変化を semi-quantitative RT-PCR 法にて検索し、細胞死に関連する因子の同定を試みた。

実験動物と実験方法

1. 動物：生後 8 週から 10 週の雄性ラットおよびマウスを使用した。ラットは Wistar King-Aptekman/Hokkaido (WKAH), Sprague-Dawley (SD), Fisher 344 (F344), non-albumin rat (NAR) を用い、マウスは C57B6, C3H, BALB/c を用いた。
2. 投与量と方法：有機水銀 methyl mercury chloride (MMC) は 0.4 mg/ml の原液を 10 倍に希釈し、体重 200 g のラットないしマウスが 1 日 20 ml 飲水すると 4 mg/kg/day 投与に相当する量を飲ませた。この条件では平均 3 週間後後肢麻痺を発症し、4 週間で瀕死となる。動物臓器での MMC の測定は国立水俣病研究所にて定量した。
3. 病理学的検索：発症動物を 4 % paraformaldehyde にて灌流固定後、小脳を採取し、Hematoxylin-eosin, Klüver-Barrera, Bodian 染色の他、免疫染色として GFAP, MRF-1 (macrophage/microglia のマーカー), *Zic1* (顆粒細胞のマーカー), Calbindin D (Purkinje 細胞のマーカー) を行い、細胞死に関しては TUNEL 染色を行った。電子顕微鏡材料は 2 % glutaraldehyde, Osmium 固定後 epon 包埋にて検索した。
4. 遺伝子発現検索：mRNA の発現検索は Northern blotting にて検討し、一部が精製した mRNA より double strand cDNA を合成し、これを鋳型として PCR 反応を行い、sequence data を Genebank database の情報と比較することにより検討した。*Zic1* 遺伝子は WKAH ラット小脳より抽出した mRNA からラット *Zic1* cDNA をクローニングし、probe として用いた。Western blotting には Caspase 1, bNOS, Fas, Fas ligand, *trk* B, Bcl-2, Bad, CAS, BDNF, Akt, RIP, TIAR, Caspase 9, Caspase 3, *Zic1* に関して調べた。正常と症状発現直前の小脳で発現の差が見られた分子に関しては semi-quantitative RT-PCR 法にて検索し定量化して比較した。

結果と考案

1. MMC 投与後の臓器障害程度の種差：体重減少は各群とも MMC 投与後 14 日目から見られ、WKAH では体重減少が最も激しかった。臓器のメチル水銀濃度は、大脳および肝臓では WKAH, NAR が他群に比べて高値を示した。マウスでは MMC 投与後 3 週間後後肢麻痺症状を呈したが小脳顆粒層細胞に変性は認められなかった。ラットにおいては WKAH で最も著明に、次いで NAR および F344 の順で小脳病変が認められた。この種差や系差は蓄積する MMC 量と関係している可能性が示唆された。
2. 病理学的所見：小脳病変は顆粒細胞の脱落であり、残存する顆粒細胞核の濃縮と断片化を認めた。濃縮核を示す細胞は顆粒層に限局して見られ、周囲組織には微小空胞化が見られた。また分子層でも微細な空胞化が見られたが、Purkinje 細胞には著変は見られず、Calbindin D 染色性も保たれていた。濃縮核は TUNEL 反応陽性でありアポトーシスと考えられた。顆粒細胞の脱落に伴って macrophage/microglia の反応が最も顕著に、ついで GFAP 陽性グリアの出現が認められた。電子顕微鏡所見ではクロマチンの凝集、電子密度の均一な小円形の凝集体の核外流出像が認められた。顆粒細胞変性に伴ってその短い軸索端や樹状突起にも空胞化変性が生じていることが判明した。
3. 顆粒層細胞変性における小脳の *Zic1* の発現：*Zic1* mRNA は病理組織学的に異常が認められない 8 日目より発現が低下し、顆粒細胞層の脱落が著明となる 28 日目では、更に低下した。抗 mouse *Zic1* 抗体を用いた免疫染色を行った結果、小脳顆粒細胞における *Zic1* 蛋白の発現が低下することが認められ、Northern blotting の結果に合致していた。*Zic1* の低下の機序についてはアポトーシス経路における *Zic1* の位置や、*Zic1* の上流や下流因子が不明であり、今後の研究課題と考えられた。
4. ラット小脳でのアポトーシス関連蛋白発現：Caspase 1 は mRNA、蛋白ともに発症後期に増加が認められた。蛋白では BDNF と *trk B* (145 kDa) は発現が上昇していた。一方、Fas ligand, Bad, Caspase 9, RIP, CAS は発現が低下しており、Bcl-2, Caspase 3, Akt, TIAR は経過を通じて変化が見られなかった。BDNF と *trk B* との増加は細胞死を阻止する方向で代償的に発現していたものと推測された。また Caspase 1 の増加にもかかわらず Caspase 3 が不変であったのは、他の経路からのシグナルが関与している可能性が示唆された。
5. MMC 投与による遺伝子発現の変化：MMC 投与前、および投与後 14 日目のラットより抽出した RNA を用いた semi-quantitative RT-PCR 法の結果、internal control と比較して変化のあった molecule は insulin receptor substrate 2, RL/IF-1 (IkB), protein phosphatase 1 β の 3 種類であり、MMC により 3 種類の molecule はいずれも低下していることが判明した。

結 語

- 1) MMC 投与による小脳顆粒細胞変性は rat で認められ、WKAH が最も感受性が高かった。
- 2) 顆粒細胞死はアポトーシスを示し、軸索や樹状突起にも空胞化変性が生じていた。
- 3) 小脳顆粒細胞特異的転写因子である *Zic1* の発現が低下していたが、アポトーシスの成立には多数の因子による正または負による複雑な制御機構が存在することが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 玉 城 英 彦

学 位 論 文 題 名

有機水銀による選択的小脳顆粒細胞死の発症機構

有機水銀 methyl mercury chloride (MMC)による選択的小脳顆粒細胞死の発症機構を *in vivo* で解析することを試みた。対象として、生後8週から10週の雄性ラットおよびマウスを使用した。ラットは Wistar King-Aptekman/Hokkaido (WKAH)、Sprague-Dawley (SD)、Fisher 344 (F344)、non-albumin rat (NAR)を用い、マウスは C57B6、C3H、BALB/c を用いた。投与量として MMC を 4mg/kg/day に相当する量で飲ませた。病理学的検索として、組織学的解析のほか、免疫組織学的に GFAP (astrocyte のマーカー)、MRF-1 (macrophage/microglia のマーカー)、*Zic1* (顆粒細胞のマーカー)、Calbindin D (Purkinje 細胞のマーカー) を染色した。酵素組織学的に Apoptosis を証明するために TUNEL 染色を行った。超微細構造は電子顕微鏡で検索した。遺伝子発現検索として、種々の分子の mRNA の発現を Northern blotting 法、semi-quantitative RT-PCR 法を用いて調べた。蛋白発現の検索に Western blotting 法を用いた。

MMC 投与後の体重変化は各群ともに MMC 投与後 14 日目から有意に減少した。なかでも WKAH が最も体重減少が著明であった。臓器のメチル水銀濃度は、発症時各群ともに大脳への蓄積量は約 10 $\mu\text{g/g}$ と少量であったが、WKAH では蓄積量が多くみられた。最も有機水銀に感受性の高かった実験動物は WKAH であり、以降の実験にはこの系を用いた。MMC 投与による WKAH ラット小脳の病理学的所見は、HE 染色で顆粒細胞の脱落と残存する核の濃縮が認められた。TUNEL 染色では濃縮核が陽性で、apoptosis の所見を示していた。MRF-1 染色で多数の microglia/macrophage がみられ、細胞崩壊産物の処理の過程と考えられた。Purkinje cell は良く保たれており、Calbindin D 染色でも正常小脳に比べ変化は見られなかった。MMC 投与群の小脳顆粒細胞電子顕微鏡像では核電子密度の上昇とクロマチンの凝集、および均一な電子密度の球状体を認め、樹状突起に相当する mossy fiber glomerulus の腫大空胞化を認めた。

Zic1 は小脳顆粒細胞に特異的に発現している zinc finger protein の一種である転写因子で小脳の発生や分化に深く関与する蛋白である。抗 mouse *Zic1* 抗体による免疫染色像では、MMC 投与群で染色強度の減少が認められた。MMC 投与後の WKAH ラット小脳から抽出した total RNA を用いた Northern blotting では、発症前から *Zic1* の発現低下が認め

られた。*Zic1*の低下の機序と apoptosis の関連については、今後の研究課題と考えられた。Apoptosis に関連する代表的な分子である Caspase 1 mRNA の変化を Northern blotting で調べたところ、MMC 投与後 19 日目に比べて投与後 24 日目では Caspase 1 の発現の増加を認めた。同様の方法で多数の apoptosis 関連因子に関して調べた結果、BDNF と *trkB* (147kDa) の発現が上昇し、Fas ligand、Bad、Caspase 9、RIP、CAS は発現が低下していた。Bcl-2、Caspase 3、Akt、TIAR は不変であった。BDNF と *trkB* との増加は apoptosis を阻止する方向で代償的に発現していたものと考えられた。

MMC 投与による apoptosis 発症前後の mRNA の変化を調べ、変化の認められた 3 つの分子に対して semi-quantitative RT-PCR を行った結果、insulin receptor substrate 2、I κ B、protein phosphatase 1 β の発現が低下していた。

以上の結果をまとめると 1) WKAH 系ラットが MMC に関して最も感受性が高かった。2) 顆粒細胞死は apoptosis を示し軸索や樹状突起にも腫大空胞化変性を認めた。3) 小脳顆粒細胞特異的な転写因子である *Zic 1* の発現が低下していた。4) Apoptosis の成立には多数の因子による正または負の複雑な制御機構が存在していた。

口頭発表に当たり、副査の吉木教授より、MMC によるヒトとラットの病理組織での類似点について、ラットの系統差について、apoptosis の最終経路について質問があった。同じく副査の玉城教授より図表の記載方法に関して、水俣病患者における多因子の関与に関する質問があった。主査の長嶋教授より酸化ストレスの関与についての質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は有機水銀による選択的な小脳顆粒細胞の細胞死の発症機序の一部を明らかにした点で優れていると判断され、今後の有機水銀による apoptosis 研究にあらたな視点を当てたことで今後の発展が期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研錬や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。