

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780221

研究課題名（和文）脳由来神経栄養因子のメチル水銀誘導性神経細胞死に対する促進作用に関する研究

研究課題名（英文）Study for accelerating effect of brain-derived neurotrophic factor on methylmercury-induced neuronal death

研究代表者

坂上 元栄（SAKAUE MOTOHARU）

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60348589

研究成果の概要（和文）：

脳由来神経栄養因子（BDNF）は、神経細胞の機能や生存維持するタンパクであるが、メチル水銀（MeHg）による神経細胞死に対しては細胞死を促進する。本研究では、その作用機序の解明を目的としてラット小脳初代培養系を用いて実験を行った。BDNF の受容体 TrkB に結合する NT-4 を処置すると、MeHg による細胞死が促進され、中和抗体による BDNF の TrkB への結合阻害によって、細胞死促進作用が消失したことから、BDNF の促進作用は、TrkB を介することが示された。本研究の結果は、BDNF 及び TrkB が神経細胞の MeHg 感受性を決定する要因であることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a maintenance protein for neuronal function and survive, but also stimulate methylmercury-induced neuronal cell death. In the present study, to expose mechanisms of the BDNF stimulation, we investigate using rat cerebellar granular cell culture system. Neurotrophin-4, another TrkB ligand, stimulated methylmercury-induced cell death. The stimulating effect of BDNF on the cell death was inhibited by treatment of anti-BDNF antibody that prevents BDNF from binding to TrkB. The results indicated that the stimulation by BDNF needs the BDNF binding to TrkB, which suggested BDNF/TrkB play as a sensitivity determinant factor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：脳由来神経影響因子，神経細胞死，小脳顆粒細胞，TrkB，初代培養系，
神経芽細胞腫由来 B35 細胞，ラット

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は神経細胞死を誘導する物質として知られている。ヒトは、現在も実際に魚介類を介して低用量ではあるがメチル水銀を曝露しており、厚生労働省が妊婦に対してメチル水銀含有量の多いマグロ等の魚介類摂取を避けるよう注意事項を発表したことからも、メチル水銀の影響の問題は、水俣病のような過去の問題ではなく、まさに現在進行形の問題であるといえる。加えて、我が国の食文化において魚介類は重要なタンパク源として中心的な食材であることから、魚介類の摂取を避けづらいことも、メチル水銀曝露影響が日本特有かつ注目される問題となる要因の一つであろう。現在摂取している用量では、メチル水銀による影響は日常生活に支障のない軽微なものであることが予想されるが、こういった社会的関心・背景から、メチル水銀による影響およびその作用機序の速やかな検討、解明が必要といえる。

メチル水銀の神経毒性発現について未解明な部分はいくつかある。その中で二つの現象、すなわち、同じ神経細胞でも成熟個体よりも胎児・発達期個体がメチル水銀の影響を受けやすいという「胎児期・発達期高感受性」、さらに、メチル水銀によって誘導される神経細胞死が脳の部位によって感受性が異なる「神経細胞間におけるメチル水銀感受性差」という現象があるが、この二つの現象を説明する作用機序が明らかになっていない。そこで、研究代表者は、この二つの現象に関する作用機序を解明するため、小脳神経細胞初代培養系を用いて、30 nM という低濃度のメチ

ル水銀で誘導される神経細胞死モデルを確立、その作用機序について検討し、細胞内 Ca²⁺濃度依存性タンパク分解酵素であるカルパインが関与することを明らかにしてきた (Sakaue et al., 2003; 2005)。一方で、このモデルでの神経細胞死を抑制する因子の探索を行い、亜セレン酸をはじめとして、ビタミン E 等だけではなく (坂上ら, 2005; Sakaue et al., 2006), 新しくビタミン K および PARP 阻害剤である DPQ が顕著に抑制することを明らかにした。その神経細胞死に影響を与える因子を探索する中で、一般に神経保護作用やシナプス可塑性の制御作用を示すとされる神経成長因子 (NGF) ファミリーの因子について、神経細胞死を抑制することを期待して検討した。しかしながら、その因子の中で脳由来神経栄養因子 (BDNF) だけが予想とは相反する結果を示した。つまり、BDNF がメチル水銀誘導性細胞死モデルにおいて細胞死を抑制するのではなく、むしろ細胞死を促進するという驚くべき結果が得られた。

2. 研究の目的

BDNF は神経細胞死を抑制する神経保護作用やシナプス可塑性の制御など、神経細胞にとって利点の多い分泌タンパク質として広く知られている。しかし、前述したように典型的な神経毒性物質 (メチル水銀) による神経細胞死誘導作用に対して、BDNF がその作用を促進するという現象は、過去に報告が全くなく、その BDNF の作用は、細胞生物学および神経毒性学的にも興味深い。従って、BDNF の作用として生理学的・毒性学的

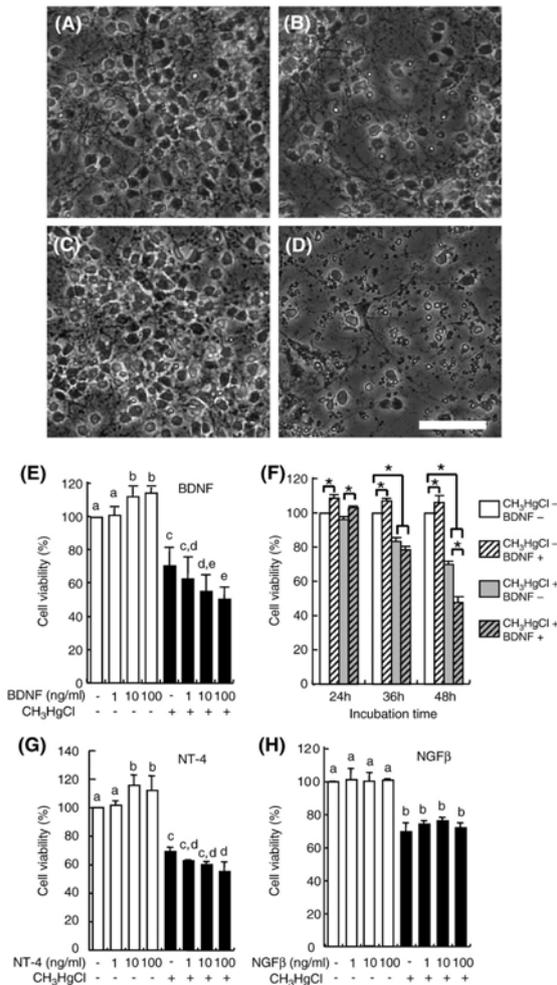


図1 小脳初代培養系におけるメチル水銀誘導性神経細胞死へのBDNFの促進作用 (A)対照群, (B)30nMメチル水銀処理群, (C)BDNF処理群, (D)BDNF+メチル水銀処理群。メチル水銀誘導性神経細胞死への(E)BDNF, (G)NT-4, (H)NGFβによる影響。(F)BDNF+メチル水銀による生存率への経時的変化。データは平均±標準偏差を示す。

にも独創的な点であると言える。本研究では、BDNFのメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用の作用機序解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と、メチル水銀及び神経栄養因子処理

生後1日以内のラットより小脳を取り出

し、トリプシンで消化、分散後、ポリリジンコートしたプラスチックシャーレ上に播種し、ラット小脳顆粒細胞初代培養 (CGC) とした。2日間の前培養を行い、メチル水銀を処理した。ラット神経芽細胞腫由来 B35 細胞については、2日間に一度は培地交換及び継代培養を行った。B35 細胞を播種し 24 時間後にメチル水銀を処理した。NGFβ及び BDNF, NT-4 はメチル水銀を処理する 1 時間前に処理し、BDNF 中和抗体は BDNF を処理する 30 分前に処理した。細胞内シグナル伝達系 (Ras/MAP キナーゼ系, PI3/Akt 系及び PLC-gamma 系) に対する阻害剤は BDNF を添加する 30 分前に添加した。

(2) B35 細胞への TrkB 強制発現細胞株の樹立

ラット大脳 cDNA より、TrkB の配列を PCR 法にて増幅し、TrkB の配列を発現ベクター pcDNA3.1 にクローニングした。Lipofectamin を使用して細胞に遺伝子導入した後、TrkB 発現細胞を選択し、実験に使用した。

細胞生存率はクリスタルバイオレット法にて推定した。

4. 研究成果

(1) メチル水銀誘導性神経細胞死に対する神経栄養因子の影響 (図 1)

メチル水銀処理後 48 時間で細胞死が誘導された。BDNF 処理のみでは、細胞生存率が増加したが、メチル水銀と BDNF の処理では、メチル水銀のみの処理よりも細胞生存率が減少した (図 1 A~E)。この作用は時間依存的に観察された (図 1 F)。さらに BDNF の受容体 TrkB に結合する NT-4 の処理によっても、メチル水銀誘導性神経細胞死を促進した (図 1 G)。一方では、NGF β 処理はメチル水銀誘導性神経細胞死を促進することはなかった (図 1 H)。これらの結果は、BDNF の受容体である TrkB が、BDNF によるメチル水銀誘導性神経

細胞死への促進作用に關与する可能性を示す。

(2) TrkB への BDNF の結合と神経細胞死促進作用との関係

BDNF によるメチル水銀誘導性神経細胞死への促進作用が TrkB への結合を介することを示すために BDNF の中和抗体を用いた。中和抗体処理によって BDNF によるメチル水銀細胞死促進作用が、抗体濃度依存的に減少した (図 2)。これらは、BDNF の作用発現に TrkB への結合が必要であることを示す。

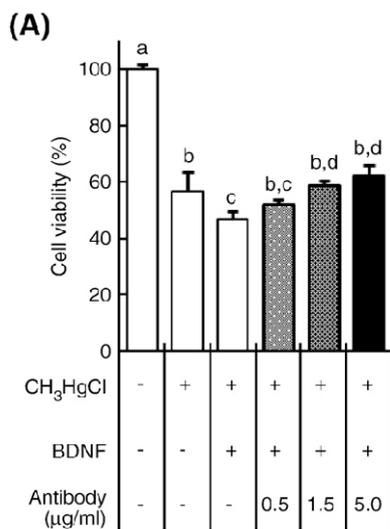


図 2 BDNF によるメチル水銀誘導性神経細胞死への促進作用における TrkB への結合の必要性
中和抗体を使用し、BDNF の細胞死促進作用への影響を検討した。データは細胞生存率の平均±標準誤差を示す。

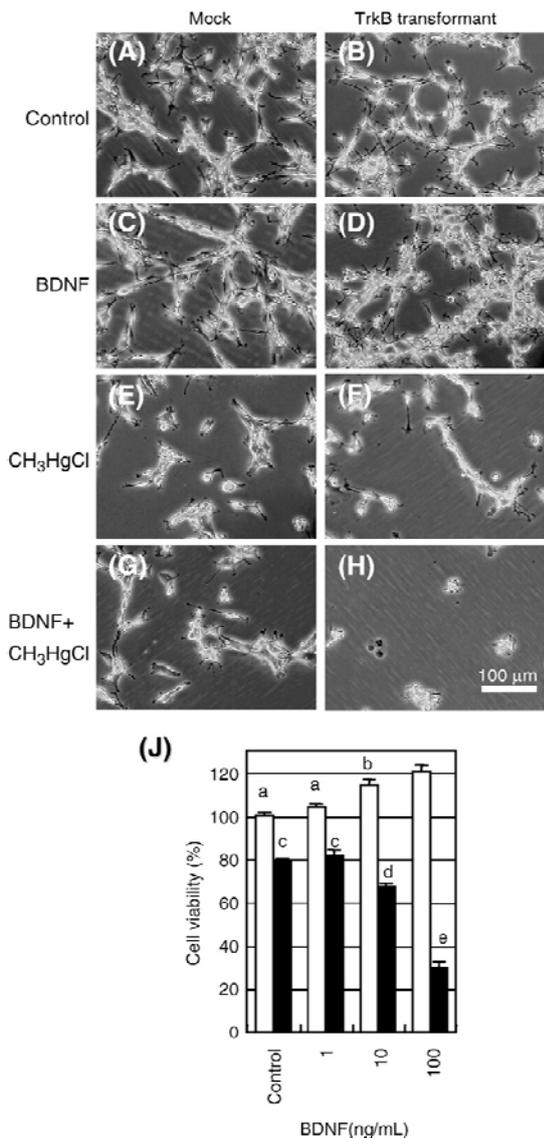


図3 B35細胞におけるBDNFのメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用へのTrkB発現の影響
A及びC, E, GはMock群, B及びD, F, HはTrkB発現群における(A, B)対照群, (C, D)BDNF処理群, (E, F)メチル水銀処理群, (G, H)BDNF+メチル水銀処理群を示す。(J)BDNFの処理濃度による細胞生存率の変化。メチル水銀無処理(□),メチル水銀処理(■)を示す。

TrkBを発現していないB35細胞株にTrkBを強制発現した細胞株を樹立し、この細胞株に対するBDNFの影響を検討した(図3)。TrkBを強制発現した細胞は、BDNFの濃度依存的にメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用を示したが(図3H)、対照群では、見られなかった(図3G)。また、TrkBによって活性化する細胞内シグナル伝達系(Ras/MAPキナーゼ系、PI3/Akt系及びPLC-gamma系)があるが、こ

れらのどのシグナル伝達系がBDNFによる細胞死促進作用に関与するかについて阻害剤を使用して検討した。Ras/MAPキナーゼ系阻害剤であるU0126がBDNFの作用を阻害したことから、Ras/MAPキナーゼ系の関与する可能性が示唆された(データ未掲載)。以上のことから、BDNFによるメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用は、TrkBに結合することが必要であることが示された。

仮にBDNFによってメチル水銀誘導性神経細胞死の促進が生体内で起こるとするならば、本研究課題によって得られた結果が、メチル水銀毒性の未解明部分である「胎児期・発達期高感受性」および「神経細胞間における感受性の差」を説明できるかもしれない(図4)。すなわち、胎児・発育個体では神経細胞保護や生存維持するためBDNF分泌が盛んであり(図4A)、成熟個体では、胎児期・発達期個体と比較してBDNF分泌量は少ない(図4B)。その状態にメチル水銀が曝露されることで、BDNF量が多い胎児期・発育期個体では、神経細胞死が誘導促進されてしまうことになる。さらに、TrkBを発現しないTrkB非発現神経細胞(図4D)は、BDNFが周囲に存在したとしても細胞は受容することがなく、メチル水銀誘導性細胞死に影響を与えることはない。一方で、TrkBを発現するTrkB発現神経細胞(図4C)は、BDNFを受容することで、メチル水銀誘導性細胞死が促進されることとなり、TrkB非発現神経細胞よりもTrkB発現神経細胞の方がメチル水銀によって細胞死が誘導されやすくなる。さらにBDNFの作用意義についても興味深い。すなわち、BDNFは発生段階において神経細胞生存維持などに不可欠なものであり、その分泌時期と部位は制御されている。生物にとってメチル水銀が摂取されることで生じる神経細胞死は、おそらく想定外であるこ

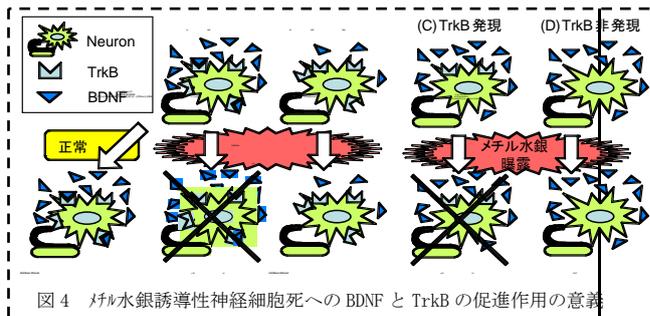


図4 メチル水銀誘導性神経細胞死へのBDNFとTrkBの促進作用の意義

とから、結果としてメチル水銀による神経細胞死を促進してしまうことになるのであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Sakaue M, Mori N, Makita M, Fujishima K, Hara S, Arishima K, Yamamoto M.

Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor in vitro. Brain Res. 査読有り, 2009, 1273:155-162.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂上元栄 (SAKAUE MOTOHARU)

研究者番号: 60348589

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし