

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号： 32701

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2010 ～ 2011

課題番号： 22780271

研究課題名（和文）

脳由来神経栄養因子の新奇作用：メチル水銀誘導性神経細胞死促進作用機序の解明

研究課題名（英文）

The novel effect of brain-derived neurotrophic factor: elucidation of the mechanism of the accelerating effect on methylmercury-induced neuronal cell 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）によるメチル水銀（MeHg）誘導性神経細胞死の機序の解明を目的として検討を行った。MeHgによる細胞死および細胞内グルタチオン量（GSH）減少をBDNFは促進した。このBDNFの作用を細胞内シグナル伝達系阻害剤のうちMEK阻害剤U0126だけが抑制し、他のMEK阻害剤では阻害されなかった。BDNFによるMeHg誘導性細胞死促進作用はGSH減少が関わること、その作用にはU0126が特異的に作用する因子が関わるということが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism of the accelerating effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on methylmercury-induced neuronal death was investigated to elucidate in the present study. BDNF accelerated the MeHg-induced cell death and reduction of intracellular glutathione level (GSH), which was inhibited by U0126, a MEK inhibitor, among inhibitors against intracellular signal transduction pathways. While, another MEK inhibitor did not. These results indicate that the accelerating effect of BDNF on MeHg-induced neuronal death includes the reduction of GSH level and is contributed by factors that U0126 specifically acts on.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：「畜産学・獣医学」・「応用獣医学」

キーワード：（1）脳由来神経栄養因子 （2）神経細胞死 （3）小脳顆粒細胞 （4）TrkB
（5）メチル水銀

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀（MeHg）は、神経細胞毒性物質であり、我々が実際に魚介類を介して曝露し続けている物質である。我が国の食文化において魚介類は重要なタンパク源であり、魚介類の摂取を避けづらいことも、MeHg曝露影響が日本特有かつ注目される問題といえる。

研究代表者はin vitroによる神経細胞死を指標にMeHgの神経細胞毒性発現機序の解明を目的として研究を行ってきた。MeHgの神経毒性発現について二つの現象、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MeHg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、MeHgによって誘導される神経細胞死が脳の部位によって異なる「神経細胞間でのMeHg感受性差」という現象があるが、これらの現象を明確に説明するに至っていない。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においてMeHgで誘導される神経細胞死モデルを確立、このモデルでの神経細胞死抑制因子の探索を行い（坂上、2005；Sakaue, 2006）、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、MeHg誘導性神経細胞死への影響を検討した。

その因子の中で脳由来神経栄養因子 (BDNF) だけが、細胞死抑制を示さず、細胞死を促進するという驚くべき結果が得られた。この細胞死促進作用は、BDNFの新奇作用であることから、その作用の詳細について検討し、BDNFとその受容体TrkBの結合が必須であることを明らかにした (Sakaue et al., 2009)。

2. 研究の目的

BDNFは「神経細胞死を抑制する神経保護作用」など、利点を示す分泌タンパク質である。しかし、典型的な環境神経毒性物質による神経細胞死誘導作用に対して、その細胞死を促進するという現象は報告がなく、そのBDNFの作用は、細胞生物学的および神経毒性学的にも興味深い。従って、本研究では、小脳初代培養細胞及び神経芽細胞腫由来株化細胞を用いて、BDNFのMeHg誘導性神経細胞死促進作用の最終的な作用点とその伝達経路を解明することを目的として、以下の仮説をもとに研究を行った。

(1) 仮説 1 : BDNFはグルタミン (GSH) 量減少誘導性細胞死を促進する

予備的実験においてTrkB強制発現安定細胞株B35^{TrkB}細胞では「グルタミン酸 (Glu) 誘導性細胞死」および「GSH合成阻害剤誘導性細胞死」をBDNFが促進した。Glu誘導性細胞死の機序には、「Glu受容体の関与」と「細胞内GSH減少の関与」の二つの機序がある (Murphy, 1989)。B35細胞にはGlu受容体がほとんど発現していないこと、MeHg誘導性神経細胞死にGSH量減少が関与すること (Sarafian, 1991)、B35細胞を用いた予備的実験において、GSH合成阻害剤誘導性細胞死をBDNFが促進することから、これらの細胞死の共通点として「細胞内GSH量減少」があげられる。従って、細胞内GSH量減少が関わる細胞死をBDNFが促進すると考えられ、この細胞死促進作用は、BDNF処理によるGSH量減少を刺激するか、もしくはGSH量減少によって生じる何らかの作用発現を刺激して生じると思われる (図 1)。本研究では、小脳神経細胞初代培養系においてもGSH量減少誘導性細胞死をBDNFが促進するかを検討し、そして、実際にBDNF処理によって細胞内GSH量が減少するかを検討した。

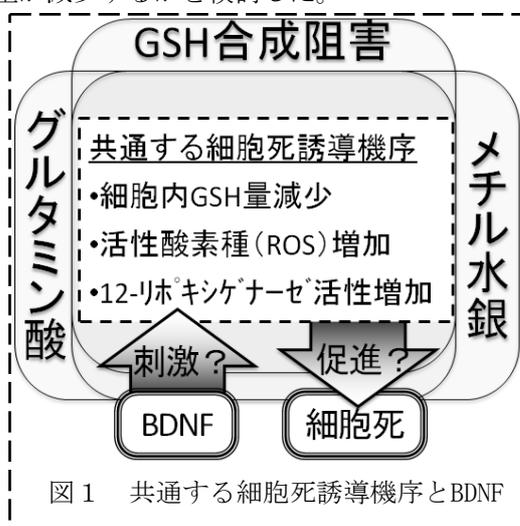


図 1 共通する細胞死誘導機序とBDNF

(2) 仮説 2 : BDNFの細胞死促進作用には12-リポキシゲナーゼ (12LOX) が関与する

神経細胞においてGSH量減少は12LOXのアラキドン酸分解作用を活性化する (Li, 1997)。この分解の際に活性酸素種 (ROS) が産生し、細胞死が誘導される (Higuch, 2007)。一方で、MeHg誘導性神経細胞死にROSとアラキドン酸産生量の増加が関与すること (Shanker, 2004) から、BDNFの細胞死促進作用は、12LOX活性化が関与する可能性がある。従って、本研究では、細胞死誘導処理およびBDNF処理における12LOX活性化の関与を特異的阻害剤を用いて検討した。

(3) その他「BDNFによるシグナルが細胞内に伝達されること」に関する検討

一般にTrkBの作用発現には細胞内シグナル伝達系が関与している。従って、BDNFの最終的な作用点とTrkBとの間には細胞内シグナル伝達系経路が関与するはずである。本研究ではTrkBが関与すると考えられる三つの経路、ホスホリパーゼC (PLC) 系、MAPK系、PI3/Akt系について、それぞれの阻害剤を使用し、BDNFの細胞死促進作用を抑制する阻害剤を検討することで、BDNFの作用が関与する経路を同定した。TrkBによって活性化のする報告があるグルタミン酸受容体の一つNMDA受容体の関連性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 小脳神経細胞初代培養：生後 2 4 時間以内のラットから小脳を取り出し、顆粒細胞を分離してこれを小脳神経細胞初代培養細胞とした。この細胞を無血清培地にて二日間培養後、実験に使用した。メチル水銀は30 nMおよび100 nMを、GSH合成系の律速酵素阻害剤buthioninesulfoximine (BSO) もしくはGSH、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) と反応してGSH量を減少させるdiethylmaleate (DEM) 処理した。各種阻害剤として、TrkBの下流シグナル伝達系である、MEK阻害剤 (U0126)、Akt阻害剤 (LY294002)、PLC γ 阻害剤 (U73122)、12LOX阻害剤、グルタミン酸受容体であるNMDA受容体阻害剤 (MK-801) を用いて、メチル水銀およびBSO、DEMを処理する 1 時間前に、BDNFは30分前に処理した。

(2) GSH量の測定：Sakaueら (2011) により報告されているように測定した。細胞を凍結融解で粉碎、遠心分離後に上清をとり、標準化のためのタンパク濃度を測定した。タンパク質を取り除きこれをGSH測定サンプルとした。実際の細胞内GSH量の測定はリサイクリング法により測定した。

(3) ウェスタンブロット法：Sakaueら (2005) により報告されているように行った。抗体は、抗リン酸化Erk1/2抗体、抗PAN-Erk1/2抗体、抗リン酸化NR1抗体、抗PAN-NR1抗体、抗MAP抗体、抗Tau抗体、抗beta-Actin抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 仮説1の検討：「仮説1：BDNFはGSH量減少誘導性細胞死を促進する」か、否かを検討した。小脳神経細胞初代培養細胞にBDNF, BSOおよびDEMを処理し、細胞生存率およびGSH量を測定した。BSO, DEM処理により有意に細胞生存率が減少し、BDNFの共処理によりさらに減少した(図2)。細胞内GSH量も同様にBSOおよびDEM単独処理によって対照群に比べて有意に減少し、BDNFとの共処理群では、GSH量はさらに減少した(図3)。メチル水銀処理によるGSH量の減少についてもBDNFによってさらに減少した。従って、MeHgによる細胞死を含むGSH量減少による細胞死を、BDNFは、GSH量をさらに減少させることで、細胞死を促進していることが示された。

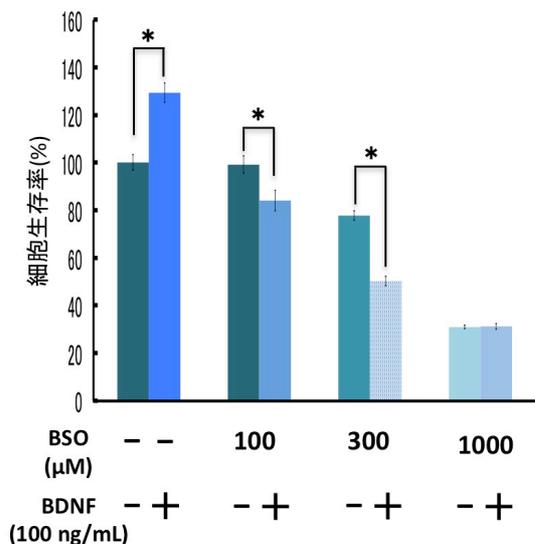


図2 細胞内GSH量減少性細胞死へのBDNFの影響

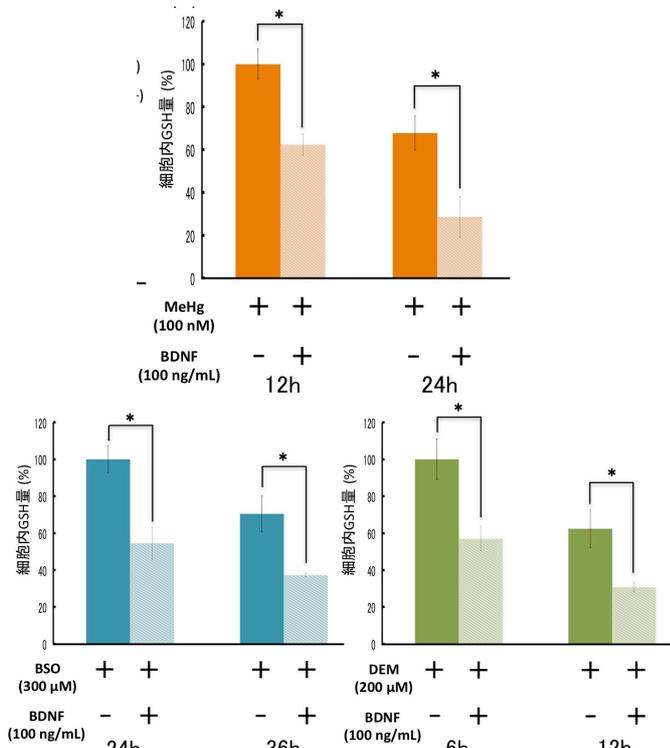


図3 細胞内GSH量へのBDNFの影響

時間は試薬添加後のインキュベート時間を示す。

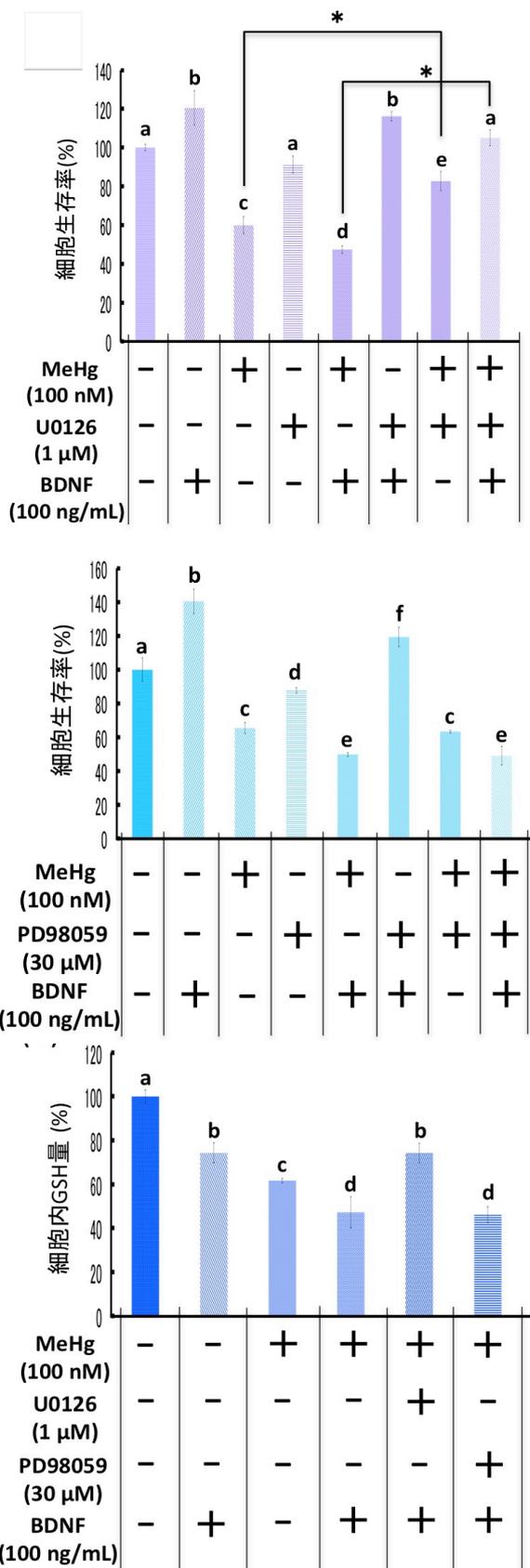


図4 細胞内GSH量へのMEK阻害剤の影響

(2) 仮説2の検討：

「仮説2：BDNFの細胞死促進作用には12LOXが関与する」か、を検討した。12LOX活性化がBDNFによるMeHg神経細胞死促進作用に関与するかを、12LOX阻害剤を処理して検討したが、メチル水銀による細胞死もBDNFによる細胞死促進作用にも変化を示さなかった。

(3) 「BDNFによるシグナルが細胞内に伝達されること」に関する検討

BDNFによるMeHg誘導性神経細胞死促進作用とTrkB下流に位置する細胞内シグナル伝達系のうち、MAPK系およびPI3/Akt系、PLCgamma系の関連について、それぞれMEK阻害剤 (U0126) , Akt阻害剤 (LY294002) , PLCγ阻害剤 (U73122) を用いて、BDNFによるMeHg誘導性神経細胞死促進作用への影響を検討したが、阻害剤の中でU0126だけが細胞死および促進作用、細胞内GSH量減少のいずれも抑制した (図4)。一方で、同じくMEK阻害剤であるPD98059はそのような影響は観察されなかった (図4下図)。Erk1/2およびAktのリン酸化状態をwestern blot法で検討した。BDNF処理によりErk1/2およびAktのリン酸化が亢進したが、BDNFによるMeHg誘導性神経細胞死促進作用を説明する結果とはならなかった。

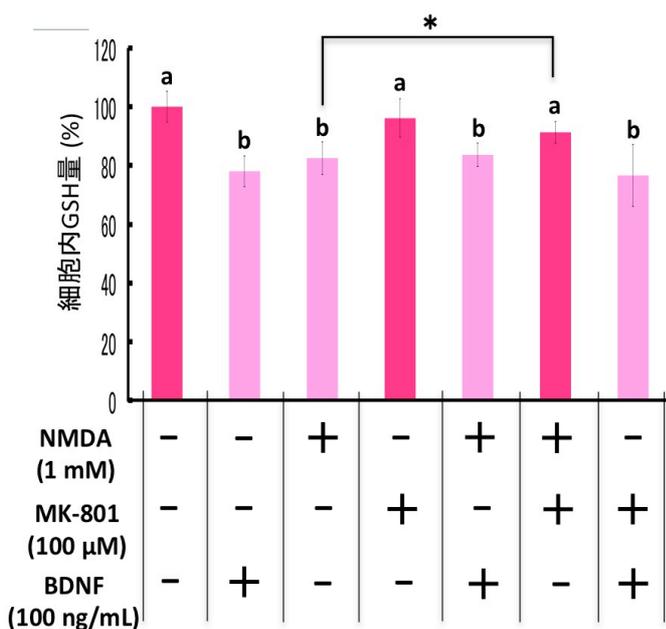
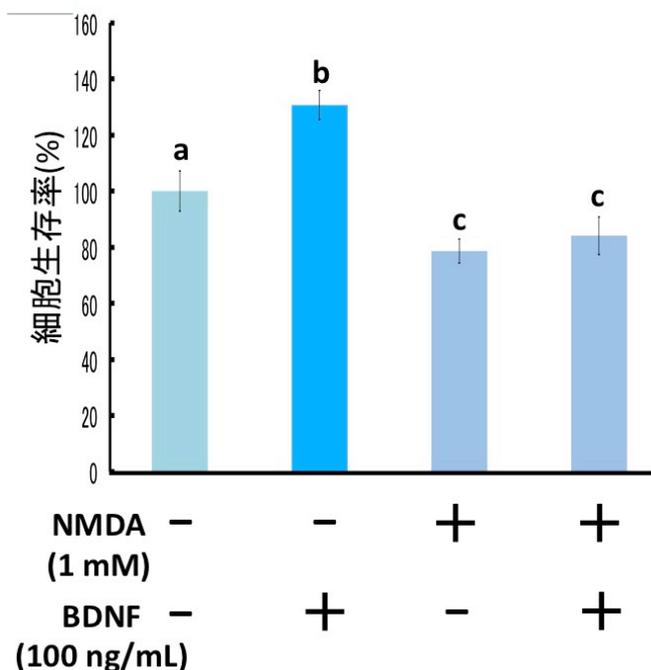


図5 NMDAによる細胞死誘導とGSH量減少へのBDNFの影響

Glu受容体であるNMDA受容体のアゴニストNMDAによる神経細胞死をBDNFが促進する報告があることから、本研究における小脳顆粒細胞初代培養細胞でも検討した。NMDAにより細胞死が誘導されNMDA受容体阻害剤MK801で抑制されたが、BDNFはその細胞死を促進しなかった (図5)。MeHg誘導性細胞死およびBDNFによる促進作用は、MK801で抑制された。細胞内GSH量では、MK801がMeHgによる減少を抑制したが、BDNF処理による減少を抑制しなかった。BDNFによるMeHg誘導性神経細胞死への促進作用およびGSH減少作用は、シグナル伝達系のうちMAPK系の阻害剤U0126の処理により抑制されたが、同じくMAPK系阻害剤であるPD98059処理では抑制されなかった。

(4) 結論

BDNFは、MeHgのように細胞内GSH量の減少に関わる細胞死を促進することが明らかとなった。また、MeHgによる細胞死とGSH減少にはNMDA受容体が関与するが、BDNFの細胞死促進作用およびGSH減少にはNMDA受容体は関与せず、U0126が関わる、MEK以外の何らかの因子が関与すると思われた。これらの結果は、メチル水銀毒性の特徴の一つである「神経細胞間でのメチル水銀感受性差」に関して、BDNFの受容体とU0126が作用する因子の有無がその感受性を決める可能性がある。今後、このU0126が作用する因子を同定することが必要である。細胞内GSH量減少を伴う神経細胞死が関与する神経疾患に関しても、BDNFが細胞死を促進させる働きを示す可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

①牧 武宏, 坂上 元栄, 金子 拓矢, 小澤 秋沙, 関口 仁美, 邊見奈津子, 門脇絵里奈, 山本雅子, 有嶋 和義 BDNFによるメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用における細胞内GSHの関与の可能性 日本獣医学会第150回学術集会 帯広畜産大学 (帯広) 2010. 9. 16-18.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究協力者

牧 武宏 (MAKI TAKEHIRO)
麻布大学大学院・獣医学研究科
博士前期課程・大学院生
研究者番号：なし