

200922001A

厚生労働科学研究費補助金  
認知症対策総合研究事業

アルツハイマー病巣での膜結合型  
プロスタグランジンE合成酵素1の  
生物学的・臨床医学的意義の解析

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 原 俊太郎  
(昭和大学薬学部)

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

アルツハイマー病巣での膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 1  
の生物学的・臨床医学的意義の解析

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 原 俊太郎

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	12

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）  
総括研究報告書

アルツハイマー病巣での膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 1  
の生物学的・臨床医学的意義の解析

研究代表者 原 俊太郎 昭和大学薬学部教授

【研究要旨】

プロスタグランジン (PG) 類の産生を抑制する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) がアルツハイマー病 (AD) の進行を抑えることが疫学的に示され、その分子機構としては NSAIDs の抗炎症作用による神経細胞死の抑制が想定されているが、PG 類産生と AD 進行との関連については未だ明確にされていない。本研究では、PG 類産生と AD 進行との関連を明らかにするために、NSAIDs の標的となる COX-2 の下流で働く mPGES-1 に注目し解析を進めている。昨年度までの研究では、まず、AD 患者脳や AD で見られる老人斑を自然発症する変異型アミロイド前駆蛋白質高発現マウス (TG2576 マウス) の脳において、mPGES-1 蛋白質が AD の特徴的病理像と重なって高発現していることを見出した。さらに、mPGES-1 の遺伝子欠損が TG2576 マウスで見られる A $\beta$  沈着部位への活性化グリアの集積、記憶機能低下を抑制することを明らかにした。*in vitro* の系においても、マウス大脳由来の初代培養神経細胞をアミロイド $\beta$ ペプチド (A $\beta$ ) で刺激すると、mPGES-1 発現が誘導され、さらにこの誘導に伴い PGE<sub>2</sub> 産生が増加することを示した。本年度は *in vitro* の解析を進め、このマウス初代培養神経細胞では A $\beta$  処理により、GFAP 陽性のアストロサイト、MAP-2 陽性のニューロン、いずれの細胞のアポトーシスも誘導されることを明らかとした。一方、A $\beta$  処理により PGE<sub>2</sub> 産生が増加しない mPGES-1 遺伝子欠損細胞では、A $\beta$  あるいは PGE<sub>2</sub> 単独で処理してもアポトーシスは誘導されないものの、A $\beta$  と PGE<sub>2</sub> の両方で処理するとアポトーシスが誘導されることがわかった。A $\beta$  による神経細胞死には、A $\beta$  による直接作用と mPGES-1 由来 PGE<sub>2</sub> を介した間接作用の両者が重要であることが考えられた。

研究分担者

中谷 良人 (昭和大学薬学部・講師)

高橋三津雄 (医療法人さわらび会福祉村病院  
院長寿医学研究所・主任研究員)

赤津 裕康 (医療法人さわらび会福祉村  
病院院長寿医学研究所・副所長)

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は高齢化社会とともにその発症率が増え、変性性認知症の中で最も発症頻度の高い疾患である。その症状は悲惨であるものの、この疾患に対

する有効な薬としては塩酸ドネペジル（アリセプト）しかなく、その治療薬の開発、より詳細なADの発症・進行の分子メカニズムの解明が望まれている。一方、プロスタグランジン（PG）類産生を抑制する非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）がADの進行を抑えることが疫学的に示され、その分子機構としてはNSAIDsの抗炎症作用による神経細胞死の抑制が想定されている（McGeer and McGeer (2007)）。しかしながらこれまでに、PG類産生とAD進行との関連についてはほとんど明確にされていない。ADの進行においては、アミロイド前駆蛋白質（APP）由来の $\beta$ ペプチド（ $A\beta$ ）が重要な役割を果たすことが知られ、ADの治療薬の標的としては $A\beta$ の切り出しに関わるプロテアーゼを中心に解析が進められている。しかし、このプロテアーゼは神経系で多彩な作用をもつため、この酵素を阻害することには多くの問題点が残されている。そこで、本研究では、炎症刺激により発現が誘導され、様々な疾患の進行に関わる膜結合型プロスタグランジンE合成酵素1（mPGES-1）に注目し、本酵素とAD進行との関連を明らかにするとともに、mPGES-1阻害剤がADに対する治療薬となりうる可能性を検証することを目的とした。

PGE<sub>2</sub>はPG類のうち生体内で最も多く存在し、胃粘膜保護等の生体恒常性の維持に加え、炎症やがんの発症や進行に関わる、多種多様な作用をもつ脂質性メディエーターである。図1にその生合成経路を示す。膜リン脂質にホスホリパーゼA<sub>2</sub>（PLA<sub>2</sub>）が作用することでアラキドン酸が切り出され、このアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ（COX）によりPGH<sub>2</sub>が生じる。

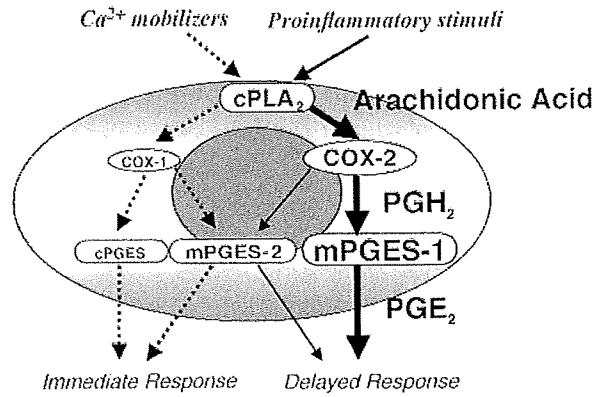


図1 PGE<sub>2</sub>の生合成経路

さらにPGH<sub>2</sub>からPGESの作用によりPGE<sub>2</sub>が産生される。COXのアイソザイムには、構成的に発現し生体の恒常性維持に働いているCOX-1に加え、炎症等の刺激により誘導されるCOX-2が存在する。古典的なNSAIDsは、COX-1とCOX-2のいずれをも阻害するために重篤な胃腸障害を引き起こすことが知られている。そこで、刺激時にのみ誘導されるCOX-2を特異的に阻害することができれば、副作用のないNSAIDsができると期待されてきた。AD患者の脳においてもCOX-2の発現上昇が見られることが報告され（Pasinetti and Aisen (1998)）、ADの治療に対しても、COX-2阻害剤の有用性が考えられた。しかし、最近になり、COX-2特異的阻害剤には、心血管リスクを上昇させるという副作用が見出され、その有用性に疑問が持たれ始めている（Hara and Kudo (2006)）。

一方、COXの下流で働くPGESには、細胞質型PGES（cPGES）、mPGES-1、mPGES-2の3種類のアイソザイムが知られているが、このうち、mPGES-1のみが誘導型酵素であり、同じ誘導型酵素であるCOX-2と選択的に機能連関することが、我々の研究により明らかにされている（Murakami et al. (2000)）。mPGES-1は、MAPEG（membrane-associated proteins

involved in eicosanoid and glutathione metabolism) family) に含まれるグルタチオン要求性の分子量約 16 キロダルトンの膜結合型酵素である。我々は、これまでに、その遺伝子欠損マウスを用い、mPGES-1 がリウマチ性関節炎や肉芽腫形成といった炎症反応進行のみならず、がんの発症や進展、転移といった現象にも深く関わることを *in vivo* で見出している (Kamei et al. (2003, 2004, 2010)、Kubota et al. (2005)、Yamakawa et al. (2008)、Hara et al. (2010))。また、同一のマウスを用い、mPGES-1 が脳梗塞後の神経のアポトーシスに関わることも示されている (Ikeda-Matsuo et al. (2006))。このため、現在では、COX-2 特異的阻害剤に代わる「副作用のない抗炎症薬」として国内外で mPGES-1 の阻害剤の開発が進められており、本研究において mPGES-1 阻害剤が AD に対しても有効なことが示唆されれば、その意義は大変大きい。

AD と PG との関連については、以前より、AD 患者の脳脊髄液において PGE<sub>2</sub> レベルが高いという報告 (Montine et al. (1999)) があったものの、PGE<sub>2</sub> がどのように AD に関わるかについての分子機構に関する研究はこれまであまりなかったが、最近になって、米国のグループから、PGE<sub>2</sub> 受容体の 1 つ EP2 がミクログリア細胞の活性化や  $\beta$  セクレターゼによる APP のプロセッシングに関わること (Liang et al. (2005)、Shie et al. (2005)) や、神経細胞死が EP2 に加え、他の受容体である EP4 により調節されていること (Echeverria et al. (2005)) が報告された。また、熊本大のグループもごく最近、EP2、EP4 が A  $\beta$  産生に関わることを報告している (Hoshino et al. (2007))。しかし、これら PGE<sub>2</sub> 受容体は

正常状態でも発現が見られ、PGE<sub>2</sub> 受容体を介するシグナルは神経細胞の生存の促進と抑制の両方の作用をもつことが示されている (McCullough et al. (2004))。一方、mPGES-1 は、その発現が炎症時やがんなどほぼ病態時に限られ、薬剤の標的としての有用性はきわめて高い。mPGES-1 と AD との関連については、第一製薬のグループが、mPGES-1 が A  $\beta$  を投与されたラットのアストロサイトで発現誘導されることを報告している (Satoh et al. (2000)) のみである。前述したように研究代表者らは、mPGES-1 が炎症やがんの発症や進展に深く関わることをその遺伝子欠損マウスにより示してきた。本研究では、遺伝子欠損マウスを用い、mPGES-1 による PGE<sub>2</sub> の異常産生が AD 進行に関わることを明らかにすることを目的とした。

また、これまでの AD と PG に関する研究はいずれも実験動物を用いた解析であり、ヒトの病態と PG 類との直接的関連については示されていない。研究分担者・高橋および赤津は神経内科医として AD 患者の治療、予防に関わると同時に、免疫組織化学的・細胞生物学的手法により、AD 進行に関わる分子の同定を試みてきた (Farkas et al. (2003))。本研究では、高橋および赤津との共同研究により AD 患者由来の試料を用いることで、より直接的にヒト疾患における AD 進行の分子機構を解明することを試みた。

## B. 研究方法

### 1) マウス胎仔大脳初代培養神経細胞の調製

野生型マウス同士または mPGES-1 遺伝子欠損マウス同士を交配し、妊娠 16.5 日の親マウスの子宮より胎仔を摘出した。こ

の胎仔の脳の細胞を、神経細胞分散システム (SUMILON) を用い分散した後、分散した細胞をポリリジンコートした dish に播き、神経細胞培養液 (SUMILON) 中 1 週間培養することより脳初代培養神経細胞を調製した。

## 2) マウス胎仔由来神経細胞の A $\beta$ 刺激

1) で調製したマウス脳初代培養神経細胞を、30  $\mu$ M の A $\beta_{31-35}$  あるいは 25  $\mu$ M の PGE $_2$  に曝し、細胞数の変化やアポトーシスの誘導について検討した。この際細胞の種類は、ニューロン、アストロサイトを、それぞれのマーカー蛋白質 MAP2、GFAP に対する抗体により染色し、確認した。

## 3) A $\beta$ 刺激によるマウス胎仔由来神経細胞のアポトーシス誘導の検討

刺激後の細胞をホルマリン-PBS で固定した後、DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System (Promega 社) を使用し、アポトーシスした細胞を TUNEL 染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用い、TUNEL 陽性細胞数をカウントし、DNase 処理したポジティブコントロールでの TUNEL 陽性細胞数に対する割合で、アポトーシス誘導の程度を評価した。

## 4) AD 患者尿・血清・脳脊髄液中の PGE $_2$ の定量

AD 患者および脳障害のある非 AD 患者より尿、血清、脳脊髄液を採取し、Cayman 社の PGE $_2$  EIA kit により、PGE $_2$  量を測定した。

(倫理面への配慮)

AD 患者および脳障害のある非 AD 患者の尿、血清、脳脊髄液中における PGE $_2$  量の測定においては、医療法人さわらび会福祉村病院において倫理委員会の承認を受け、患者に対するインフォームドコンセン

トを徹底した。

また、マウスを用いた解析においては、昭和大学の実験動物指針に従って実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) mPGES-1 遺伝子欠損下での実験的 AD の発症：マウス胎仔脳初代培養神経細胞を用いた解析

昨年度までの解析により、マウス胎仔脳由来の初代培養神経細胞を A $\beta$  で処理すると、mPGES-1 発現が誘導され、さらにこの誘導に伴い PGE $_2$  産生が増加することを示した。さらに、この培養神経細胞は A $\beta$  に長時間曝すと細胞増殖が抑制されるが、mPGES-1 遺伝子欠損マウスから調製した神経細胞の細胞増殖の抑制は対照マウス由来の細胞に比べ低下することも明らかとなった。本年度はまず細胞免疫染色により、この対照マウス由来細胞では、A $\beta$  で 72 時間処理すると、GFAP 陽性のアストロサイト、MAP-2 陽性のニューロン、いずれの細胞の増殖も抑制されることを明らかとした。一方、mPGES-1 遺伝子欠損細胞では、A $\beta$  処理により、アストロサ

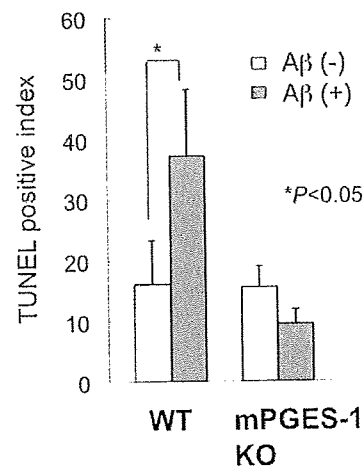


図2 A $\beta$  によるマウス初代培養神経細胞のアポトーシスの誘導

イト、ニューロン、いずれの細胞の増殖にも抑制は観察されなかった。

さらに本年度は、TUNEL アッセイにより、対照マウス由来細胞で見られた細胞増殖の抑制がアポトーシスによるものであることを見出した。一方、mPGES-1 遺伝子欠損細胞を A $\beta$  で 72 時間処理してもアポトーシスは誘導されなかった (図 2)。また、mPGES-1 遺伝子欠損細胞を PGE<sub>2</sub> 単独で 72 時間処理してもアポトーシスは誘導されなかったが、A $\beta$  と PGE<sub>2</sub> の両者で処理するとアポトーシスが誘導されることもわかった (図 3)。A $\beta$  による神経細胞死には、A $\beta$  による直接作用と mPGES-1 由来 PGE<sub>2</sub> を介した間接作用の両者が重要であることが考えられた。

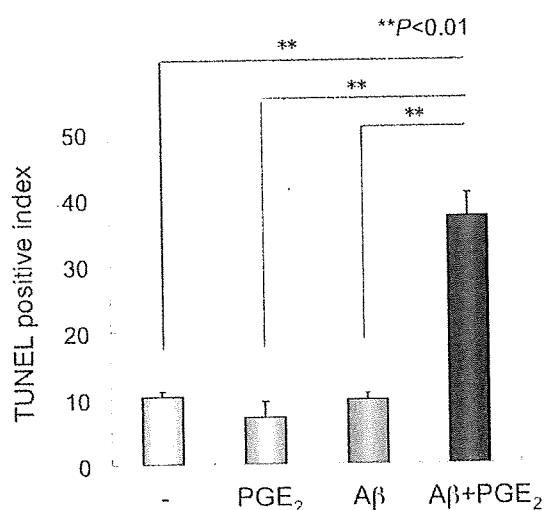


図 3 A $\beta$  および PGE<sub>2</sub> による mPGES-1 欠損培養神経細胞のアポトーシスの誘導

## 2) AD 患者試料における PGE<sub>2</sub> 量の変動

AD 患者 17 例 (年齢 59~90 歳 (平均 80.4  $\pm$  8.9 歳)) および脳障害のある非 AD 患者 25 例 (年齢 56~101 歳 (平均 83.6  $\pm$  10.4 歳)) の尿、血清中の PGE<sub>2</sub> 量を測定したところ、AD 患者の尿、血清でそれぞれ 1.06  $\pm$  0.95 ng/ml、0.90  $\pm$  1.70 ng/ml、非 AD 患者の尿、血清でそれぞれ 0.95  $\pm$  0.55 ng/ml、0.48  $\pm$  0.90 ng/ml の PGE<sub>2</sub> が検出された。尿、血

清のいずれの PGE<sub>2</sub> 量も、AD 患者において、非 AD 患者に比べてやや多く検出されたが、個々のばらつきが大きく、有意な差は認められなかった。

さらに、AD 患者の脳脊髄液中の PGE<sub>2</sub> 量についても測定したが、9 例 (年齢 70~89 歳 (平均 81.9  $\pm$  6.6 歳)) 中 2 例しか PGE<sub>2</sub> は検出できず、その量も 12~17 pg/ml 程度であった。

## D. 考察

本年度の解析では、まず、マウス胎仔大脳由来初代培養神経細胞を A $\beta$  で 72 時間処理すると、GFAP 陽性のアストロサイト、MAP-2 陽性のニューロン、いずれの細胞の増殖も抑制されること、さらにこの増殖抑制はアポトーシスの誘導によることを明らかにした。一方、mPGES-1 遺伝子欠損マウス由来の細胞を A $\beta$  あるいは PGE<sub>2</sub> 単独で 72 時間処理してもアポトーシスは誘導されなかった。A $\beta$  と PGE<sub>2</sub> の両者で処理するとアポトーシスが誘導されることから、A $\beta$  による神経細胞死には、A $\beta$  による直接作用と mPGES-1 由来 PGE<sub>2</sub> を介した間接作用の両者が重要であることが示唆された。

これまでに Shie らにより、ミクログリアに存在する PGE<sub>2</sub> 受容体 EP2 の活性化が、A $\beta$  によるニューロンの細胞死において重要であることが報告されている (Shie et al. (2005))。彼らは、野生型マウス由来のニューロンを野生型マウス由来のミクログリア存在下 A $\beta$  で処理すると観察される細胞死が、野生型マウス由来の代わりに、EP2 欠損マウス由来のミクログリア存在下処理すると減弱することを明らかにした。彼らの結果は、A $\beta$  刺激に伴い産生された PGE<sub>2</sub> が、EP2 受容体



を介しミクログリアを活性化し、この活性化されたミクログリアが活性酸素や NO などの神経傷害物質を放出することで、神経細胞死を引き起こす可能性を示唆しているが、本研究の結果から考えると、このミクログリアを活性化する PGE<sub>2</sub> の産生を mPGES-1 が担っていると推測される。

これまでの本研究の解析では、*in vitro* の系に加え、*in vivo* の mPGES-1 遺伝子欠損 TG2576 マウスを用いた系でも、mPGES-1 に依存し産生された PGE<sub>2</sub> が、ミクログリアを活性化し、この活性化したミクログリアが AD 様病態の進行においてきわめて重要な役割を果たしていることを示してきた。これらの結果は、mPGES-1 阻害剤はミクログリアの活性化を抑えることにより、AD に対し有効である可能性を強く示している。しかし一方で、ミクログリアの活性化は AD の初期段階においては、A $\beta$  を消去することにより、AD の進行抑制にも関わることが示されている (El Khoury and Luster (2008))。今後は、ミクログリアの活性化をどのタイミングで止めることが有効かについても解析する必要があると考えられる。

さらに本年度は、AD 患者および脳障害のある非 AD 患者より得られた尿、血清、脳脊髄液中の PGE<sub>2</sub> 量を測定した。しかし、いずれの試料においても、検体数が少ないためか、個々のばらつきが大きく、AD 患者と非 AD 患者の間で PGE<sub>2</sub> 量に有意な差は認められなかった。今後はさらに検体数を増やし、AD の進行度合と PGE<sub>2</sub> 量との関係についても検討することを計画している。

## E. 結論

本年度の解析により、mPGES-1 の遺伝子欠損により A $\beta$  による神経細胞のアポトーシスが抑制されることが示された。この結果は、mPGES-1 阻害剤が AD に対し有効である可能性を強く示している。今後は、mPGES-1 の阻害剤がどのような副作用を起こし得るかについての解析も重要である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Motoharu Sakaue, Naoko Mori, Misato Makita, Kana Fujishima, Shuntaro Hara, Kazuyoshi Arishima and Masako Yamamoto. Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by grain-derived neurotrophic factor *in vitro*. *Brain Res.* 1273, 155-162 (2009. 6)
- (2) Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yuka Sasaki, Yoshihito Nakatani, Masataka Majima, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Shuntaro Hara and Ichiro Kudo. Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contribute to tumor growth, invasion and metastasis. *Biochem. J.* 425, 361-371 (2010. 1)
- (3) Shuntaro Hara, Daisuke Kamei, Yuka Sasaki, Akemi Tanemoto, Yoshihito Nakatani and Makoto Murakami. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* in press.

(4) Yoshiharu Akitake, Yukiko Kuroki, Yuka Sasaki, Masato Hosokawa, Daisuke Kamei, Hiroyasu Akatsu, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Yoshihito Nakatani, Ichiro Kudo, Shuntaro Hara and Mitsuo Takahashi. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency attenuates neuronal cell death and mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. 投稿中

## 2. 学会発表

[国際学会]

(1) Shuntaro Hara. Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in Alzheimer's disease pathology. 4th International Conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators (PLM2009) (2009. 5)

(2) Yuka Sasaki, Daisuke Kamei, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii and Shuntaro Hara. Role of microsomal prostaglandin E synthase (mPGES-1) in chemical carcinogen-induced colon carcinogenesis. 4th International Conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators (PLM2009) (2009. 5)

(3) Shuntaro Hara and Yukiko Kuroki. Pathological roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) in Alzheimer's disease. 50th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2009) (2009. 9)

(4) Yuka Sasaki, Daisuke Kamei, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii and Shuntaro Hara. Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES-1) deficiency suppresses chemical carcinogen-induced colon carcinogenesis. 50th International Conference on the Bioscience of Lipids

(ICBL2009) (2009. 9)

(5) Shuntaro Hara, Yoshiharu Akitake, Yukiko Kuroki, Yuka Sasaki, Daisuke Kamei and Mitsuo Takahashi. Involvement of microsomal prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) in Alzheimer's disease. 11th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (2009. 10)

[国内学会]

(1) 上山修平、上山梓、佐々木由香、原俊太郎 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1/プロスタサイクリン合成酵素ダブルノックアウトマウスの作製とその性状解析 第53回日本薬学会関東支部大会 (2009. 10)

(2) 佐々木由香、亀井大輔、石川由起雄、石井壽晴、原俊太郎 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) の欠損によるプロスタグランジン産生バランスの変化に伴う発がん抑制作用 第82回日本生化学会大会 (2009. 10)

(3) 黒木由紀子、畠山里美、佐々木由香、亀井大輔、中谷良人、原俊太郎 βアミロイドによる神経細胞死における膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1の機能解析 フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009. 11)

(4) 上山修平、上山梓、佐々木由香、原俊太郎 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素-1/プロスタサイクリン合成酵素ダブルノックアウトマウスの作製とその性状解析 フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009. 11)

(5) 佐々木由香、亀井大輔、松本このみ、石川由起雄、石井壽晴、原俊太郎 マウス大腸における化学発がんへの膜結

合型プロスタグランジン E 合成酵素  
(mPGES-1) の関与 第8回次世代を  
担う若手ファーマ・バイオフィォラム  
2009 (2009. 11)

(6) 原俊太郎、亀井大輔、佐々木由香、  
中谷良人 膜結合型プロスタグランジ

ンE合成酵素 mPGES-1 は新たな創薬の  
標的となりうるか 日本薬学会第 130  
年会 (2010. 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

《参考文献》

- Echeverria, V., Clerman, A. and Doré, S. (2005) Stimulation of PGE<sub>2</sub> receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following  $\beta$ -amyloid exposure. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2199-2206.
- El Khoury, J. and Luster, A.D. (2008) Mechanisms of microglial accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 626-632.
- Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyi, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N. and Okada, H. (2003) Complement C5a receptor-mediated signaling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 5764-5771.
- Hara, S. and Kudo, I. (2006) COX-2 inhibitors and the risk of cardiovascular events. *Jpn. Med. Assoc. J.* 49, 276-278.
- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, A., Nakatani, Y. and Murakami, M. (2010) Prostaglandin E synthases: understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* in press.
- Hoshino, T., Nakaya, T., Homan, T., Tanaka, K., Sugimoto, Y., Araki, W., Narita, M., Narumiya, S., Suzuki, T. and Mizushima, T. Involvement of prostaglandin E<sub>2</sub> in production of amyloid- $\beta$  peptides both *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 282, 32676-32688.
- Ikeda-Matsuo, Y., Ota, A., Fukada, T., Uematsu, S., Akira, S. and Sasaki, Y. (2006) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11790-11795.
- Kamei, D., Murakami, M., Nakatani, Y., Ishikawa, Y., Ishii, T. and Kudo, I. (2003) Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 19396-19405.
- Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J. Biol. Chem.* 279, 33684-33695.
- Kamei, D., Murakami, M., Sasaki, Y., Nakatani, Y., Majima, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Hara, S. and Kudo, I. (2010) Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contribute to tumor growth, invasion and metastasis. *Biochem. J.* 425, 361-371.
- Kubota, K., Kubota, T., Kamei, D., Murakami, M., Kudo, I., Aso, T. and Morita, I. (2005) Change in prostaglandin E synthases (PGEs) in microsomal PGES-1 knockout mice in a preterm delivery model. *J. Endocrinol.* 187, 339-345.
- Liang, X., Wang, Q., Hand, T., Wu, L., Breyer, R.M., Montine, T.J. and Andreasson, K. (2005) Deletion of the prostaglandin E<sub>2</sub> EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 10180-10187.
- McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M. and Andreasson, K. (2004) Neuroprotective function of the PGE<sub>2</sub> receptor in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 24, 257-268.
- McGeer, P.L. and McGeer, E.G. (2007) NSAIDs

- and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging* 28, 639-647.
- Montine, T.J., Sidell, K.R., Crews, B.C., Markesbery, W.R., Marnett, L.J., Roberts, L.J. 2nd and Morrow, J.D. (1999) Elevated CSF prostaglandin E<sub>2</sub> levels in patients with probable AD. *Neurology* 53, 1495-1498.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S. and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32783-32792.
- Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-ishi, S. and Tanabe, T. (2002) Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene: Essential role of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* 277, 28601-28608.
- Pasinetti, G.M. and Aisen, P.S. (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87, 319-324.
- Satoh, K., Nagano, Y., Shimomura, C., Suzuki, N., Saeki, Y. and Yokota, H. (2000) Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in  $\beta$ -amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 283, 221-223.
- Shie, F.S., Breyer, R.M. and Montine, T.J. (2005) Microglia lacking E prostanoid receptor subtype 2 have enhanced A $\beta$  phagocytosis yet lack A $\beta$ -activated neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* 166, 1163-1172.
- Yamakawa, K., Kamekura, S., Kawamura, N., Saegusa, M., Kamei, D., Murakami, M., Kudo, I., Uematsu, S., Akira, S., Chung, U.I., Nakamura, K. and Kawaguchi, H. (2008) Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum.* 58, 172-183.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Motoharu Sakaue, Naoko Mori, Misato Makita, Kana Fujishima, Takeshi Kumagai, Shuntaro Hara, Kazuyoshi Arishima, Masako Yamamoto.	Acceleration of methyl-mercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor in vitro.	Brain Research	1273	155-162	2009
Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yuka Sasaki, Yoshihito Nakatani, Masataka Majima, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo	Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis.	Biochemical Journal	425 (2)	361-371	2010
Shuntaro Hara, Daisuke Kamei, Yuka Sasaki, Akemi Tanemoto, Yoshihito Nakatani, Makoto Murakami	Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models.	Biochimie	in press		2010

研究成果の刊行物・別刷

1. Motoharu Sakaue, Naoko Mori, Misato Makita, Kana Fujishima, Shuntaro Hara, Kazuyoshi Arishima and Masako Yamamoto.  
Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by grain-derived neurotrophic factor in vitro.  
*Brain Res.* 1273, 155-162 (2009)
2. Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yuka Sasaki, Yoshihito Nakatani, Masataka Majima, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Shuntaro Hara and Ichiro Kudo.  
Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contribute to tumor growth, invasion and metastasis.  
*Biochem. J.* 425, 361-371 (2010)
3. Shuntaro Hara, Daisuke Kamei, Yuka Sasaki, Akemi Tanemoto, Yoshihito Nakatani, Makoto Murakami.  
Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models.  
*Biochimie* 印刷中 (2010)
4. Yoshiharu Akitake, Yukiko Kuroki, Yuka Sasaki, Masato Hosokawa, Daisuke Kamei, Hiroyasu Akatsu, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Yoshito Nakatani, Ichiro Kudo, Shuntaro Hara and Mitsuo Takahashi.  
Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency attenuates neuronal cell death and mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model.  
投稿中


**Research Report**

# Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor *in vitro*

Motoharu Sakaue<sup>a,b,\*</sup>, Naoko Mori<sup>b</sup>, Misato Makita<sup>b</sup>, Kana Fujishima<sup>b</sup>, Shuntaro Hara<sup>c</sup>, Kazuyoshi Arishima<sup>a</sup>, Masako Yamamoto<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Anatomy II, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara 229-8501, Japan

<sup>b</sup>Department of Public Health and Molecular Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

<sup>c</sup>Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

**ARTICLE INFO**
**Article history:**

Accepted 15 March 2009

Available online 28 March 2009

**Keywords:**

TrkB  
BDNF  
NT-4  
B35 cell line  
Methylmercury  
Primary culture

**ABSTRACT**

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the nerve growth factor (NGF) family and has been shown to promote neuronal survival and contribute to neural development. Although methylmercury, a neurotoxin, induces the cell death of neurons *in vitro*, there is little information regarding the effects of neurotrophins on the methylmercury-induced cell death of neurons. In the present study, we investigated the effect of BDNF on methylmercury-induced cell death in a primary culture of rat cerebellar granular cells. BDNF increased the viability of the cultured cells when treated alone, but unexpectedly accelerated the cell death induced by administration of methylmercury. Among other growth factors tested, only neurotrophin-4 (NT-4) demonstrated a similar acceleration of methylmercury-induced cell death. The cell death-accelerating effect of BDNF was inhibited by a BDNF-neutralizing antibody or a MAPK inhibitor. To determine whether the effect of BDNF occurs via TrkB, a receptor of BDNF and NT-4, we investigated the effects of BDNF and methylmercury in a TrkB transformant of rat neuroblastoma B35 cells. The methylmercury-induced cell death of the TrkB transformant was accelerated by BDNF, while that of the mock transformant was not. These results indicate that BDNF accelerates methylmercury-induced cell death via TrkB, at least *in vitro*, and suggest that BDNF and TrkB may also contribute to the sensitivity of neurons to methylmercury toxicity.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

The neurotrophin family, which includes nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF),

neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin-4/5 (NT-4/5), regulates the survival and functions of central and peripheral neurons (Snider, 1994). BDNF has been well investigated with regard to these functions and regulations in the central

\* Corresponding author. Department of Anatomy II, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara 229-8501, Japan. Fax: +81 42 769 1620.

E-mail address: [sakaue@azabu-u.ac.jp](mailto:sakaue@azabu-u.ac.jp) (M. Sakaue).



nervous system, and has been shown to confer protection against various types of neuronal cell death, including serum-deprived, excitotoxic, and oxidative stress-mediated death. Neural cells secrete BDNF to serve as a paracrine or endocrine factor for the survival of neurons and for maintenance of neural normal function. The effects of BDNF are mediated by its binding to tropomyosin-related kinase (Trk) B, a neurotrophin receptor, with high affinity, after which TrkB processes signal transduction through primarily three signaling pathways—the mitogen-activated protein kinase (MAPK), the phospholipase C (PLC)  $\gamma$ , and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. TrkB binds not only BDNF, but also NT-4/5 with high affinity and NT-3 with lesser affinity. In contrast, TrkA binds NGF and TrkC binds NT-3 specifically, after which both these Trks process signal transduction in the same manner as TrkB (for review, see Bibel and Barde, 2000; Reichardt, 2006) in order to realize the neurotrophic effects. Phenotypic analysis in BDNF- or TrkB-null mice has revealed that BDNF and TrkB are essential for normal brain development (Snider, 1994). Furthermore, even in adults, BDNF plays an important role as a modulator in synaptic development and plasticity in learning and memory.

Methylmercury is well known as a neurotoxicant. Methylmercury toxicity involves disruption of intracellular homeostasis with, for example, increases in intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) concentrations, reactive oxygen species production and extracellular concentration of glutamate via inhibition of glutamate uptake of astrocytes (Sarafian and Verity, 1991; Aschner et al., 1993; Marty and Atchison, 1997; Sakaue et al., 2005). Cerebellar granule cells, which are particularly vulnerable to methylmercury-induced damage *in vivo*, have provided a good model for analysis of methylmercury-induced neuronal cell death *in vitro* (Dare et al., 2000; Castoldi et al., 2000). We have previously investigated the mechanisms of methylmercury toxicity and screened growth factors and chemicals in order to identify those that confer protection against methylmercury (Sakaue et al., 2005; 2006; 2008). In the present study, we continued this investigation by examining whether BDNF, which has been shown to protect against some types of cell death, would also protect against methylmercury-induced cell death in a primary culture of rat cerebellar granular cells. Our results unexpectedly demonstrated that BDNF accelerates methylmercury-induced cell death. To investigate the possible mechanism of this effect, we used a stable transformant of TrkB in rat neuroblastoma B35 cells, and showed that TrkB was involved in the acceleration of methylmercury-induced cell death by BDNF.

## 2. Results

### 2.1. BDNF increases methylmercury-induced cell death of rat cerebellar granule cells

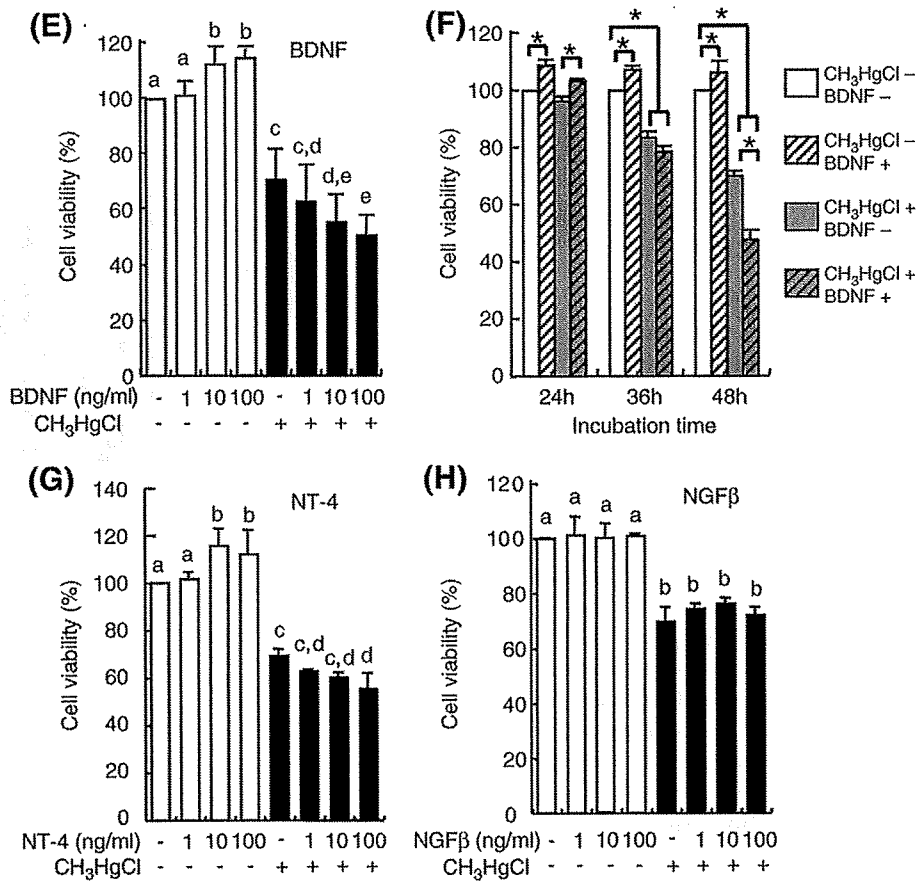
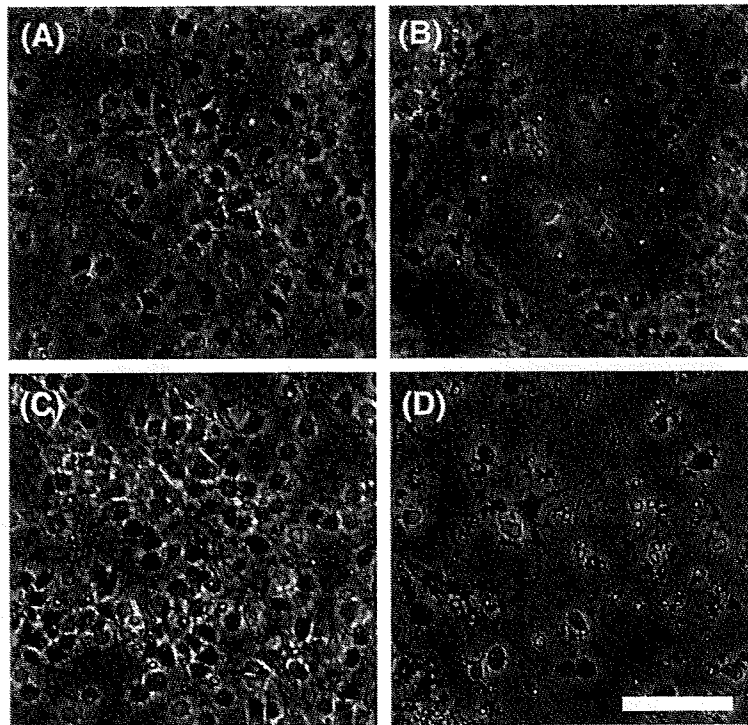
To examine the effects of BDNF on the neurotoxicity of methylmercury, we measured the viability of rat cerebellar granule cells after treatment of BDNF, methylmercury, or both, expecting that BDNF would exhibit a neurotrophic action. Treatment with methylmercury alone significantly decreased the viability of the cells to approximately 70% of that of non-treated cells ( $p=0.002$ ; Figs. 1B and E). Treatment with BDNF alone significantly increased the viability of the cells to approximately 115% of that of non-treated cells ( $p<0.001$ ). However, co-treatment with BDNF and methylmercury further decreased the viability of the cells to 50.4%, which was significantly lower than the viability of the methylmercury-treated cells ( $p=0.009$ ). Both the increase and decrease of the cell viability occurred in a BDNF concentration-dependent manner (Figs. 1D and E). In addition, co-treatment with BDNF and methylmercury had different effects on the cell viability depending on whether the incubation time was 24 h or 48 h. At 24 h of incubation, the viability of cells co-treated with BDNF and methylmercury was 103%, significantly greater than the 96% viability of cells treated with methylmercury alone ( $p=0.009$ ). Conversely, at 48 h of incubation, the viability of co-treated cells was 47.8%, significantly smaller than the 69% viability of methylmercury-treated cells ( $p<0.001$ ). Thus the accelerating effect of BDNF on the methylmercury-induced cell death appeared only after incubation for 24 h, increased between 24 h and 48 h of incubation, and was slightly but not significantly apparent after incubation for 36 h ( $p=0.065$ ; methylmercury-treated versus co-treated cells) (Fig. 1F). Therefore these results indicate that BDNF functions as an accelerator of cell death after methylmercury cytotoxicity begins to appear in primary cultured cells, but not before.

NT-4 is another ligand of TrkB (Bibel and Barde, 2000; Reichardt, 2006). Accordingly, we next examined whether NT-4 also accelerates methylmercury-induced cell death. When administered singly, NT-4 at 100 ng/ml significantly increased cell viability to 115% compared with control cells ( $p=0.01$ ). However, the viability of cells co-treated with methylmercury and NT-4 was significantly decreased compared to the viability of treated with methylmercury alone (Fig. 1G;  $p=0.004$ ). This effect of NT-4 on methylmercury-induced cell death occurred in a concentration-dependent manner. The percentages of viable NT-4-treated, methylmercury-treated, and NT-4/methylmercury co-treated cells were 115%, 69%, and

**Fig. 1 – BDNF accelerates methylmercury-induced cell death in a primary culture of rat cerebellar granule cells. (A–D)** Phase-contrast micrographs of cerebellar granular cells in BDNF-treated culture. The microphotographs show (A) control, (B) methylmercury-treated (30 nM), (C) BDNF-treated (100 ng/ml), and (D) methylmercury and BDNF-treated (30 nM and 100 ng/ml) cells. Bar=50  $\mu\text{m}$ . Cerebellar granule cell viability was assayed 48 h after treatment with methylmercury (30 nM) and/or with the neurotrophins (E and F) BDNF, (G) NT-4, or (H) NGF $\beta$ . (F) Alteration of the BDNF effect at 100 ng/ml on the cell viability over time. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (E, G, H,  $n=3$ ; F,  $n=4$ ) of the percentage of cell viability compared to the group without methylmercury and BDNF treatments. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA with Fisher's PLSD test as a post-hoc test. \*, a, b, c, and d denote significant differences between different letters ( $p<0.05$ ).

55%, respectively. This result indicates that NT-4 accelerated methylmercury-induced cell death in a manner similar to BDNF, and suggests that TrkB is involved in the mechanism of the BDNF effect. Finally, because NGFβ also has the ability

to bind to TrkA, we examined whether NGFβ had any effect on methylmercury-induced cell death. However, treatment of cerebellar neurons with NGFβ and methylmercury did not significantly alter the viability of cells compared with



treatment by methylmercury alone ( $p=0.441$ ), and in fact, treatment with NGF $\beta$  alone did not induce a significant change in viability compared with the non-treated control cells (Fig. 1H;  $p=0.753$ ).

## 2.2. The acceleration of the cell death by BDNF involves its binding to TrkB and MAP signal transduction

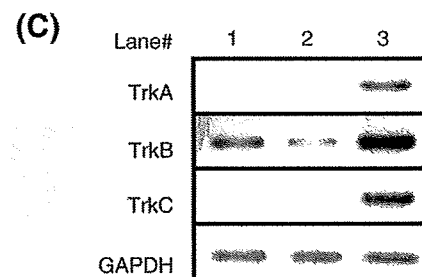
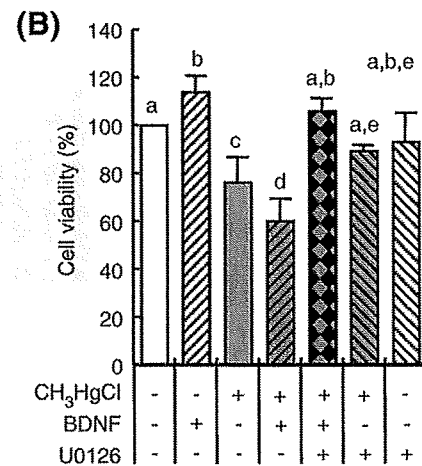
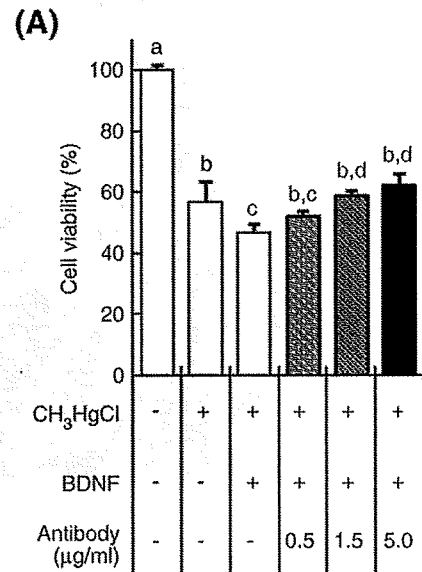
BDNF and NT-4 bind to TrkB and activate it, which initiates signal transductions. To clarify whether BDNF binding to TrkB and activation of the signal transduction of MAP are involved in the effect of BDNF, we elucidated the effects of a BDNF-neutralizing antibody and MAPK inhibitor on the acceleration of methylmercury-induced cell death by BDNF. As shown in Fig. 2A, the viability of the cells co-treated with methylmercury and BDNF was 46%, and that of the cells co-treated with plus BDNF-neutralizing antibody was 64%, which indicates that the treatment with the BDNF-neutralizing antibody significantly suppressed the BDNF-induced acceleration of cell death. This suppression was in a concentration-dependent manner of the antibody ( $p<0.001$ , methylmercury/BDNF co-treated versus plus the neutralizing antibody co-treated cells).

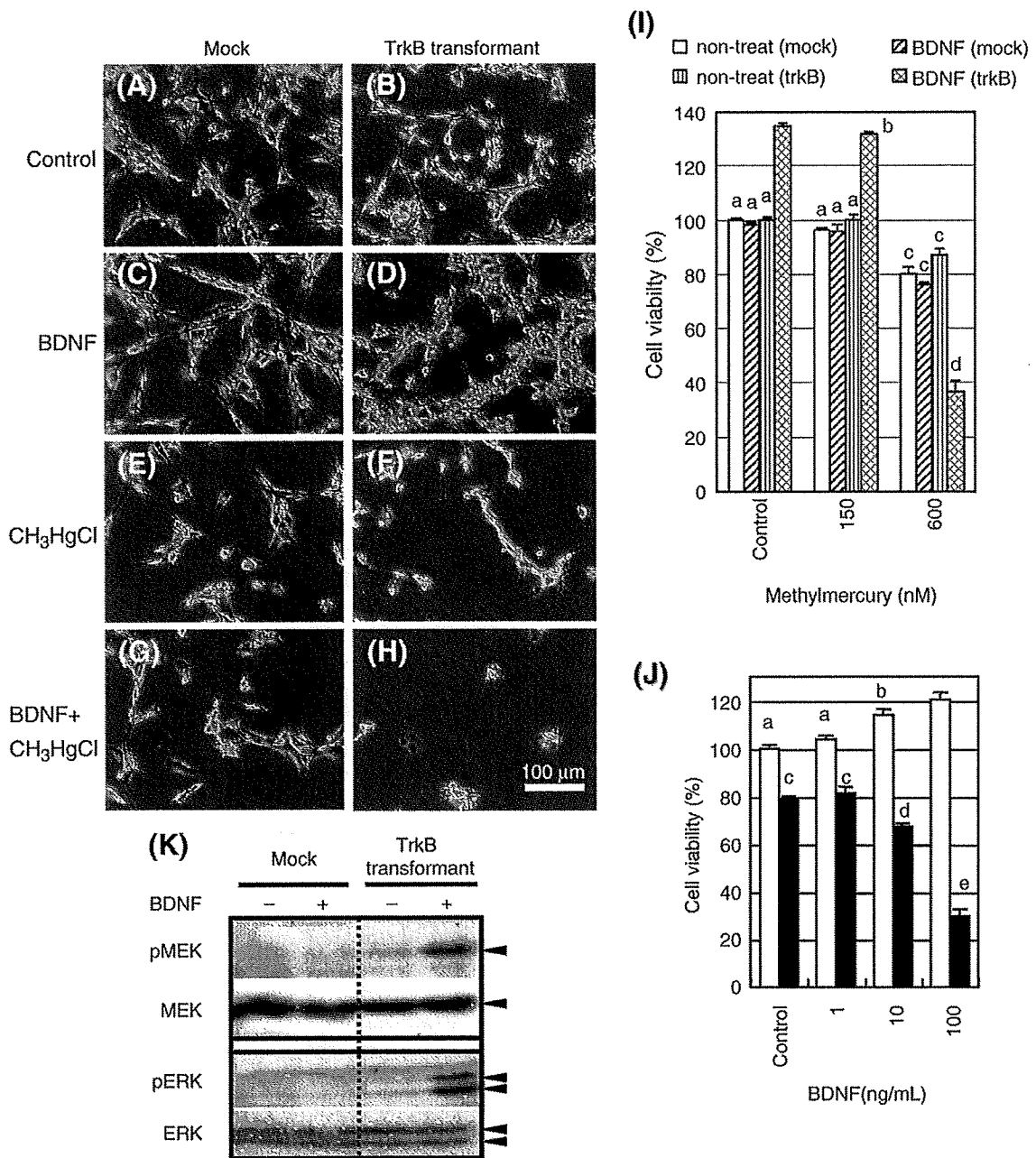
A MAPK inhibitor, U0126, suppressed the cell death induced by co-treatment with methylmercury and BDNF or by treatment with only methylmercury (Fig. 2B). These results indicate that the MAPK inhibitor inhibited not only the accelerating effect of BDNF on methylmercury-induced cell death, but also the cell death induced by methylmercury alone. The cell viability of the cells co-treated with methylmercury, BDNF, and the MAPK inhibitor, tended to be lower than the cell viability of BDNF-treated cells, which suggests that U0126 prevented BDNF from acting as an accelerator and a neurotrophic factor by inhibiting the MAPK pathway. Furthermore, to examine the mRNA expression of the neurotrophin receptors, TrkA, TrkB, and TrkC, total RNAs from the primary cultured cerebellar cells and from the cerebrum as a positive control were subjected to RT-PCR. mRNA expression of all Trks was detected in the cerebrum. However, only TrkB mRNA was intensively expressed among receptors in the

primarily cultured cerebellar cells, while mRNA expression of TrkA and TrkC was not observed (Fig. 2C).

To examine whether TrkB is involved in the effect of BDNF on methylmercury cytotoxicity, we performed experiments using a stable transformant for TrkB (Fig. 3). BDNF significantly increased the viability of the TrkB transformant cells, to 135%, but not that of the mock transformant cells. These effects indicate that the over-expressed TrkB protein can function normally in TrkB-transformant cells, and that BDNF has a neurotrophic effect on the TrkB-transformant cells through TrkB. In the group treated with 150 nM methylmercury, the viability was similar between the both trans-

**Fig. 2 – Involvement of TrkB and its signal cascade in the acceleration of methylmercury-induced cell death by BDNF treatment (10 ng/ml). Cell viability was assayed 48 h after methylmercury treatment at 30 nM. (A) Inhibitory effect of the neutralizing antibody against BDNF and (B) inhibitory effect of the MAPK inhibitor, U0126 (30  $\mu$ M) on the augmentation of cell death by BDNF. (A and B) Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (A,  $n=4$ ; B,  $n=3$ ) of the percentage of cell viability compared to the group without methylmercury and BDNF treatments. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA with Fisher's PLSD test as a post-hoc test. a, b, c, d, and e denote significant differences between different letters ( $p<0.05$ ). (C) RT-PCR analysis of the mRNA expression of neurotrophin receptors in a primary culture of rat cerebellar granule cells (lanes #1 and 2) and cerebrum (lane #3). The cDNAs for the PCR templates were synthesized from total RNA that was independently prepared from the primary cultures of rat cerebellar granule cells or the whole cerebrum of an adult rat.**





**Fig. 3** – TrkB expression is necessary for BDNF to act as an accelerator for methylmercury-induced cell death in the stable transformant of the TrkB expression vector. The cells, mock (A, C, E, G) and TrkB (B, D, F, H) transformants, were incubated and then fixed 40 h after methylmercury treatment. Phase-contrast micrographs show the results in (A, B) control, (C, D) BDNF-treated, (E, F) CH<sub>3</sub>HgCl-treated, (G, H) or BDNF plus CH<sub>3</sub>HgCl-treated cells. (I) Viability of the stable transformant 40 h after treatment. The concentration of BDNF is 100 ng/ml. Bar=100 μm. (J) BDNF alters the viability of the TrkB transformant cells in a dose-dependent manner. The TrkB transformant cells were incubated with methylmercury at 0 nM (white bar) or 600 nM (black bar). Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3) of the percentage of cell viability to mock control at (I) or to control treated with 0 nM of methylmercury at (J). Statistical analyses were performed using two-way ANOVA with Fisher's PLSD test as a post-hoc test. a, b, c, d, and e denote significant differences between different letters (p < 0.05). (K) Detection of phosphorylated ERK (pERK) and MEK (pMEK) to confirm the function of the expressed TrkB in the mock or TrkB transformants with (+) or without (-) BDNF treatment. Cell lysates were subjected to Western blotting, and the results were confirmed with anti-pERK, anti-ERK, anti-pMEK or anti-MEK antibodies.

formants. In contrast, in the cells treated with 600 nM methylmercury, the cell viabilities of both transformants significantly decreased to approximately 80%. Only the

viability of the TrkB-transformant cells treated with BDNF fell further, to 38% (Fig. 3I; p < 0.001; 600 nM methylmercury-treated versus plus BDNF-treated cells of TrkB-transformant).