

cAMP アナログが誘導する培養アストロサイトの星状化に及ぼす メチル水銀の影響

Influence of Methylmercury on Stellation Induced by a cAMP Analog in Cultured Astrocytes

足立 達美¹⁾・清水 秀明¹⁾・岩館 誠実²⁾・柳澤 泰任¹⁾

Tatsumi ADACHI¹⁾, Hideaki SHIMIZU¹⁾, Tomomi IWATATE²⁾ and Yasuhide YANAGISAWA¹⁾

我々は、ラット新生仔の脳半球から得られたアストロサイトを dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) 含有無血清培地で培養し、2 μ M 以上のメチル水銀を曝露すると、3 時間以内に形態が星状から石垣状に変化することを明らかにしてきた。本研究では、前処理されたメチル水銀がアストロサイトの形態変化に及ぼす影響を明らかにするために、脳半球アストロサイトを 15%血清含有培地で培養し、メチル水銀 (2 μ M) または溶媒 (エタノール) のみを 3 時間曝露してから、dbcAMP 含有無血清培地に交換し、アストロサイトの形態と水銀蓄積量の経時変化を調べた。溶媒のみを曝露した対照細胞では培地交換後 1 時間以内にほぼすべての細胞が急速に星状化し、24 時間後までその形態を保持していた。メチル水銀を曝露した細胞では、培地交換の 1 時間後には石垣状の形態の細胞も見られたが一部の細胞で星状化が始まっており、3-6 時間で対照細胞と同様にほとんどの細胞が星状の形態を示した。水銀蓄積量は、培地交換後低下し続けたが、特に最初の 6 時間は低下速度が速かった。以上の結果から、メチル水銀は、星状のアストロサイトを石垣状に変化させるだけでなく、cAMP アナログが誘導するアストロサイトの星状化を抑制することが明らかになった。また、アストロサイトの星状化の進行が水銀蓄積量の低下と関係している可能性が示唆された。

キーワード: メチル水銀, アストロサイト, 形態, 水銀蓄積量

I. はじめに

神経系は、主に神経細胞とグリア細胞によって構築されている。グリア細胞の一つであるアストロサイトは、細胞外液の恒常性維持、神経伝達物質の代謝など中枢神経系において重要な役割を果たしている¹⁾。アストロサイトは生体内で扁平な幼弱型アストロサイト (石垣状)

から突起を伸ばした分化型アストロサイト (星状) に発達し、損傷時には分化型アストロサイトから石垣状の反応性アストロサイトに変化することが知られており、この生体内での形態変化は *in vitro* でも再現が可能である²⁾。培養アストロサイトの形態は、cAMP の上昇により石垣状から星状に変化し²⁻⁷⁾、エンドセリン²⁾ やリゾフォスファチジン酸 (LPA)⁴⁻⁶⁾ などによって星状から石垣状に変化することが明らかになっている。

水銀は、常温、常圧において液体で存在する唯一の金属元素である⁸⁾。水銀化合物はその化学形態により物理化学的性質だけでなく生体内動態や毒性が大きく異なることが知られている。本研究で用いるメチル水銀は、1956 年に熊本県水俣市で発生が確認された水俣病の原因物質であり、消化管から容易に吸収され、血液-脳関門などの

連絡先: 足立達美 tadachi@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部薬科学科

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2023 年 10 月 2 日受付, 2024 年 1 月 15 日受理)

組織関門を容易に通過し、中枢神経障害を引き起こす^{8,9)}。メチル水銀による神経毒性の発現機構に関しては、メチル水銀が神経細胞にアポトーシスを誘導する¹⁰⁻¹²⁾ことが報告されてきているが、未だに不明な点が数多く残されている。メチル水銀が神経伝達物質の1つであるグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みを抑制する^{13,14)}ことは古くから知られており、メチル水銀によるアストロサイトの機能障害が神経障害の発現や増強に関与していると考えられてきた。その後、特に大脳皮質において、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬であるMK-801がメチル水銀が誘導する神経細胞死を抑制することが明らかになり、グルタミン酸がメチル水銀の神経毒性に関与していることが示唆されている^{15,16)}。

我々は、これまでに培養アストロサイトを用いて種々の培養条件下における水銀化合物の影響を検討してきた。アストロサイトにおける水銀化合物に対する感受性(生細胞数の低下)には、メチル水銀と無機水銀イオン(Hg^{2+})の間で顕著な差が見られたものの、培養条件に関わらず大脳半球アストロサイトと小脳アストロサイトの間で部位差は見られなかった¹⁷⁾。一方、dibutyl cyclic AMP (dbcAMP) 存在下で星状化したアストロサイトの形態は、メチル水銀3 μM を3時間曝露することにより大脳半球アストロサイトではほとんどの細胞が石垣状に変化した。小脳アストロサイトでは多くの細胞が星状のまま残っており、同じ濃度の無機水銀イオンは両部位のアストロサイトの形態にほとんど影響を与えなかった⁶⁾。さらに、星状の大脳半球アストロサイトにメチル水銀を曝露した場合は、2 μM 以上の濃度で3時間以内に形態が石垣状に変化することや、このアストロサイトの形態変化が水銀蓄積量の変動と密接に関係していることも明らかになった⁷⁾。培養アストロサイトの形態変化に関しては、これまでにLPAの影響について詳細に検討が行われており、LPAが誘導するアストロサイトの星状から石垣状への形態変化には、アクチンストレスファイバーの形成が伴われることや、低分子量Gタンパク質Rho(特にRhoA)の活性化が関与していること^{4,5)}並びに、アストロサイトにLPAで前処理を行っておくと、dbcAMPによる形態変化(星状化)やストレスファイバーの消失が抑制され、このLPAの効果にもRhoが関与していることが示唆されている¹⁸⁾。メチル水銀が誘導する培養アストロサイトの形態変化は、LPAによる形態変化と類似点が多い⁶⁾ことから、メチル水銀の前処理がdbcAMPによるアストロサイトの星状化に影響を与えることも考えられる。

本研究では、メチル水銀がdbcAMPによるアストロサイトの星状化を抑制するかどうかを明らかにすることを目的として、血清存在下でメチル水銀を曝露し、dbcAMP含有無血清培地に交換後のアストロサイトの形態変化を、溶媒のみを曝露した対照細胞と比較した。さらに、アス

トロサイトの形態変化が水銀蓄積量と関係しているかどうかを明らかにするために、アストロサイトにおける水銀蓄積量の培地交換後の経時変化を調べた。

II. 実験方法

1. 実験動物

日本クレア株式会社より8週齢で購入した雌雄のWistar系ラットを馴化期間後に交配し、妊娠ラットは出産までケージ毎に1匹ずつで飼育し、生後24時間以内の新生仔を実験に使用した。ラットは温度($22.5 \pm 2.5^\circ C$)、湿度($55 \pm 10\%$)、及び、照明時間(12時間:7:00点灯、19:00消灯)が制御されている飼育室に収容し、実験動物用飼料(Laboratory Animal Diet, PMI Nutrition International)と飲料水(水道水)を自由摂取させた。

実験は、千葉科学大学動物実験委員会の承認を得て、本学動物実験規定に従い実施した。

2. アストロサイトの培養

アストロサイトの調製は既報⁷⁾に準じて行った。ラット新生仔にペントバルビタールナトリウムを投与してから脳を摘出し、最小必須培地(MEM)の入ったシャーレの中で脳幹部などを除去して大脳半球を得た。次に、実体顕微鏡下で髄膜を除去し、トリプシン処理を行った。15%血清含有培地[Basal Medium Eagle with Earle's salts supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, U.S.A.), 0.1% L-glutamine, 0.6% D-glucose, antibiotics (Penicillin-Streptomycin; Invitrogen Co.), and an antimycotic (Fungizon; Invitrogen Co.)]を加え、遠心分離(1,000 rpm, 5 min)して上清を除去した後、再度15%血清含有培地を加えてパスツールピペットで細胞を分散した。得られた細胞懸濁液はセルストレイナー(BD Bioscience, Billerica, MA, U.S.A.)でろ過し、ろ液を遠心分離(1,000 rpm, 5 min)してから上清を除去し、15%血清含有培地を加えて細胞を再懸濁した。この細胞懸濁液を組織培養用フラスコ(25 cm^2 ; BD Bioscience)に撒き込み、 CO_2 インキュベーター(37°C, 6% CO_2)でコンフルエントに達するまで培養してから、少量の15%血清含有培地存在下で振盪することにより接着性の弱い細胞を除去した。残った細胞(アストロサイト)をトリプシンで剥離して、15%血清含有培地に懸濁し、ポリ-L-リシン(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)をコートした24穴または6穴プレート(BD Bioscience)に撒き込み、85~95%コンフルエントに達してから実験に用いた。

3. メチル水銀の曝露と培地交換

塩化メチル水銀(東京化成株式会社)の曝露は既報¹⁷⁾に準じて行った。メチル水銀は最終濃度が2 μM となる

ように培地に添加し、対照細胞には溶媒（エタノール）のみを曝露した。

曝露を3時間行った後で培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水（カルシウム、マグネシウム不含）[PBS (-)]

で洗浄してから、既報¹⁷⁾に準じて調製した無血清培地に最終濃度が0.5 mMになるようにdbcAMP (Sigma) を添加した培地で、アストロサイトを培養した。

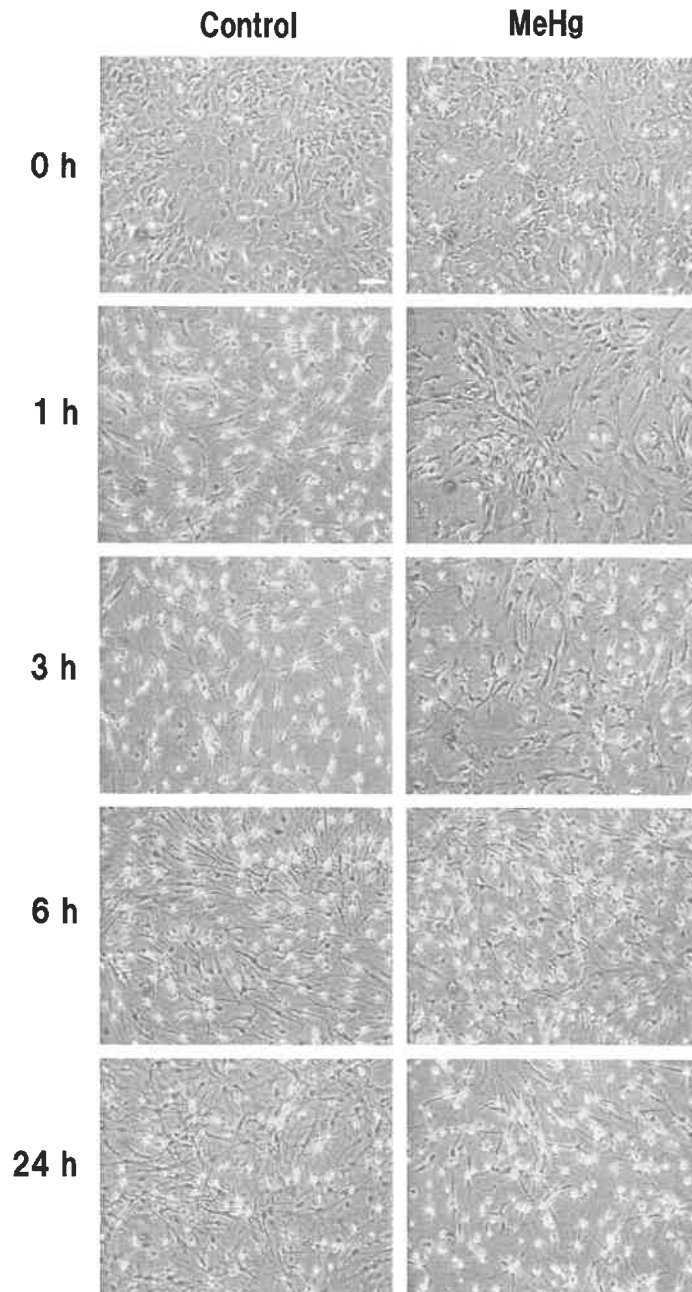


Fig. 1. Influence of Pretreatment with Methylmercury (MeHg) on Shape Change after Medium Change in Cultured Astrocytes Prepared from the Cerebral Hemisphere

Cells maintained in 15% fetal calf serum (FCS)-containing medium were exposed to MeHg (2 μ M) or ethanol (control) for 3 h, after which the medium was changed to a serum-free defined medium (SFDM) containing 0.5 mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP). Cells were fixed with 1% glutaraldehyde before (0 h), or 1, 3, 6 or 24 h after the medium change. Bar = 50 μ m.

4. 位相差画像の撮影

培地交換の直前 (0)、及び、1、3、6、24 時間後に、24 穴プレートに最終濃度が 1% になるようにグルタルアルデヒドを加えて細胞の固定を行い、細胞の位相差画像を撮影した。

5. 水銀蓄積量の測定

水銀蓄積量の測定は、既報^{6,7,17)}に準じて以下のように実施した。培地交換の直前 (0)、及び、1、3、6、12、24 時間後に、6 穴プレートの培地を除去し、PBS (-) で洗浄後、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液に細胞を溶解して水銀蓄積量測定用の試料とした。試料中の総水銀量は加熱気化水銀分析装置 MA-2 (日本インスツルメンツ株式会社) を用いて、タンパク質量は Bio-rad DC Protein Assay Kit を用いて測定し、水銀蓄積量はタンパク質量当たりの総水銀濃度 ($\mu\text{g Hg}/\text{mg protein}$) で表した。

6. 統計

一元配置分散分析後にダンカンの新多重範囲検定 (Duncan's new multiple range test) を行った。有意水準は 0.05 (5%) とした。

III. 結果・考察

アストロサイトの星状化に及ぼすメチル水銀の影響を明らかにするために、培養アストロサイトにメチル水銀 ($2 \mu\text{M}$) または溶媒のみを 3 時間曝露してから、培地を dbcAMP 含有無血清培地に交換し、細胞の形態の経時変化を調べた。メチル水銀の曝露の有無に関わらず、培地交換前 (0 時間後) のアストロサイトは石垣状の形態であった (Fig. 1)。メチル水銀の曝露を行わなかった対照細胞では培地交換後 1 時間以内にほとんどの細胞が星状化し、24 時間後までその形態を維持していた (Fig. 1)。一方、メチル水銀を曝露した細胞では、培地交換 1 時間後には石垣状の細胞も見られたものの一部の細胞で星状化が始まっており、時間経過とともに星状の細胞の割合が上昇して行き、3-6 時間後には、対照細胞と同様に、ほとんどの細胞が星状の形態を示した (Fig. 1)。これらの結果から、メチル水銀は dbcAMP が誘導するアストロサイトの星状化を抑制する (遅延させる) 作用を有することが明らかになった。このことは、培養アストロサイトの形態に対して、メチル水銀が LPA と類似の影響を与えるという報告⁶⁾を支持する結果であると考えられるが、LPA は低分子量 G タンパク質の Rho を介して dbcAMP によるアストロサイトの星状化やストレスファイバーの消失に影響を与える¹⁸⁾こと、及び、LPA^{4,5)}と同様に、メチル水銀が誘導する星状から石垣状への形態変化にも Rho が関与していること¹⁹⁾から、本研究におけるメチル水銀によるアストロサイトの星状化の遅延にも Rho が関

与している可能性が高いと考えられる。

次に、メチル水銀曝露 ($2 \mu\text{M}$, 3 時間) 後に dbcAMP 含有無血清培地で培養したアストロサイトを用いて、培地交換後の水銀蓄積量の経時変化を調べた。水銀蓄積量は培地交換前 (0 時間後) をピークに時間の経過とともに低下し続けた (Fig. 2)。水銀蓄積量の低下速度は培地交換の 6 時間後頃までは速く、急速に培地交換前の蓄積量の 50% を下回ったが、それ以降の低下速度は緩やかになった (Fig. 2)。我々は、メチル水銀の曝露を受けた培養アストロサイトにおいて、星状から石垣状への形態変化と水銀蓄積量の間に関連があることを示唆している⁷⁾。メチル水銀によるアストロサイトの星状化の抑制 (遅延) は、水銀蓄積量の急速な低下が見られた 3-6 時間後頃に解消した (Fig. 1 及び 2) ことから、dbcAMP が誘導するアストロサイトの星状化に対するメチル水銀による抑制効果も、水銀蓄積量と関係していると考えられる。

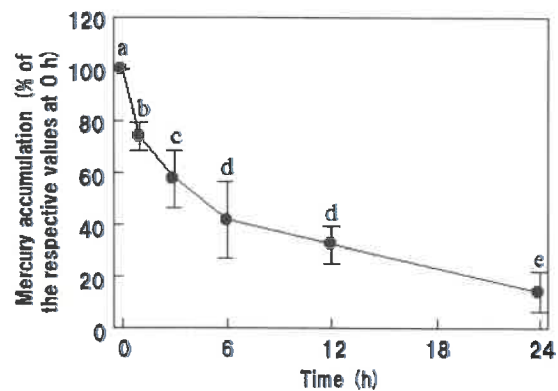


Fig. 2. Time-dependent Change in Mercury Accumulation in Cultured Astrocytes Prepared from the Cerebral Hemisphere

Cells maintained in 15% FCS-containing medium were exposed to MeHg ($2 \mu\text{M}$) for 3 h, after which the medium was changed to a 0.5 mM dbcAMP-containing SFDM. Cells were lysed before (0 h), or 1, 3, 6, 12 or 24 h after the medium change. Values represent the mean \pm S.D. of the percentages in relation to the mercury concentration at 0 h obtained from 4 independent determinations in triplicate. Values with different letters (a-e) are significantly different ($p < 0.05$).

以上の結果から、培養アストロサイトにおける cAMP アナログが誘導する石垣状から星状への形態変化は、水銀蓄積量の低下に伴って進行していくものの、メチル水銀の前処理によって抑制されることが明らかになった。

参考文献

- 1) Carlson NR 著, 泰羅雅登, 中村克樹 監訳 : 第4版 カールソン神経科学テキスト 脳と行動. 丸善出版, 東京, 2013.
- 2) 深水昭吉, 粕谷善俊 : “脳の損傷と再生に関わるシグナル伝達—循環ペプチド因子の病態生理学的役割”, イラスト医学&サイエンスシリーズ 13 わかる脳と神経. 石浦章一編集. 羊土社, 東京, 88-95, 1999.
- 3) Nelson RB, Siman R : Thrombin and its inhibitors regulate morphological and biochemical differentiation of astrocytes. *in vitro*. *Dev. Brain Res.*, **54**, 93-104, 1990.
- 4) Suidan HS, Nobes CD, Hall A, Monard D : Astrocyte spreading in response to thrombin and lysophosphatidic acid is dependent on the Rho GTPase. *Glia*, **21**, 244-252, 1997.
- 5) Ramakers GJA, Moolenaar WH : Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp. Cell Res.*, **245**, 252-262, 1998.
- 6) Adachi T, Katamoto Y, Iwatate T, Yanagisawa Y, Yasuda I : Region-dependent differences in morphological changes induced by mercury compounds and lysophosphatidic acid in cultured rat astrocytes. *Univ. Bull. Chiba Inst. Sci.*, **12**, 1-10, 2019.
- 7) Adachi T, Shimizu H, Kawasumi K, Suzuki Y, Hayashi T, Tsurusaki R, Watanabe Y, Iwasaki M, Yanagisawa Y, Yasuda I : Dose-related difference and involvement of tyrosine phosphorylation in methylmercury-induced morphological change in cultured astrocytes obtained from rat cerebral hemisphere. *BPB Reports*, **6**, 16-20, 2023.
- 8) 喜田村正次, 近藤雅臣, 滝澤行雄, 藤井正美, 藤木素士 : 水銀, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1976.
- 9) World Health Organization (WHO) : Environmental Health Criteria 101, Methylmercury, WHO, Geneva, 1990.
- 10) Kunimoto M : Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 310-317, 1994.
- 11) Nagashima K, Fujii Y, Tsukamoto T, Nukuzuma S, Satoh M, Fujita M, Fujioka Y, Akagi H : Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol.*, **91**, 72-77, 1996.
- 12) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Rostene W, Godefroy D, Takashima A : Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1, leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology*, **30**, 16-22, 2009.
- 13) Brookes N, Kristt DA : Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂ and methylmercury in astrocytes: Selectivity and reversibility. *J. Neurochem.*, **53**, 1228-1237, 1989.
- 14) Aschner M, Eberle NB, Miller K, Kimelberg HK : Interactions of methylmercury with rat primary astrocyte cultures: inhibition of rubidium and glutamate uptake and induction of swelling. *Brain Res.*, **530**, 245-250, 1990.
- 15) Miyamoto K, Nakanishi H, Moriguchi S, Fukuyama N, Eto K, Muraio K, Wakamiya J, Arimura K, Osame M : Involvement of enhanced sensitivity of *N*-methyl-D-aspartate receptor in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. *Brain Res.*, **901**, 252-258, 2001.
- 16) Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*, **17**, 37-45, 1996.
- 17) Adachi T, Kunimoto M : Acute cytotoxic effects of mercuric compounds in cultured astrocytes prepared from cerebral hemisphere and cerebellum of newborn rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2308-2311, 2005; corrected in *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 930, 2010.
- 18) Manning Jr TJ, Rosenfeld SS, Sontheimer H : Lysophosphatidic acid stimulates actomyosin contraction in astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, **53**, 343-352, 1998.
- 19) Shimizu H, Aoki W, Fujieda T, Adachi T : Involvement of Rho in methylmercury-induced morphological change in cultured astrocytes obtained from rat cerebral hemisphere. *BPB Reports*, in press.

We recently demonstrated that morphology changed from stellate to polygonal within 3 h after methylmercury (MeHg) exposure at more than 2 μ M in astrocytes prepared from the cerebral hemisphere of newborn rats and maintained in a serum-free defined medium (SFDM) containing dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP). In this study, to elucidate the influence of MeHg pretreatment on astrocyte shape changes, cerebral hemisphere astrocytes cultured with 15% serum-containing medium were exposed to MeHg (2 μ M) or vehicle (ethanol) alone for 3 h. The medium was then changed to dbcAMP-containing SFDM, and time-dependent changes in cell morphology and mercury accumulation were examined. Almost all control cells exposed to vehicle alone changed to a stellate shape within 1 h, and maintained that shape until 24 h after the medium change. In the cells exposed to MeHg, although the shape of some cells was polygonal at 1 h, that of other cells had begun to change to stellate, and at 3-6 h after the medium change almost all cells had changed to a stellate shape. Mercury accumulation continued to decrease after the medium change, and the rate was especially fast within the first 6 h. The present results indicate that MeHg, in addition to causing the shape to change from stellate to polygonal, suppressed stellation induced by a cAMP analog. They also suggest that the progress of stellation induced by the cAMP analog in astrocytes may be related to the decrement of mercury accumulation.

Key Words: Methylmercury, Astrocyte, Morphology, Mercury accumulation