

神経細胞の初代培養法の改良

石井 一 宏

京大・ウイルス研・細胞生物学部門

1. はじめに

神経細胞の初代培養を用いた研究は、神経科学の一研究分野として重要な役割を果たしてきた。たとえば、神経栄養因子やペーター・アミロイドタンパク質など生体機能分子のバイオアッセイ、神経細胞の分化の研究、シナプス形成や神経回路形成機構の研究などである。

しかし、この培養法には大きな困難点がある。培養後数日以内に大半の細胞が死滅することである。この神経細胞死を防ぐ手段はいろいろと工夫されてきた。培養液に神経栄養因子を添加すること、グリア細胞をフィーダーとして用いること、サンドイッチ法、すなわち、低酸素下で培養することなどである。これらの方法はそれぞれ一応の効果をあげてきたが、やはり一長一短がある。その理由は神経細胞死のメカニズムとも関係しており、この点についてはまたの機会に論じたい。

さて、私たちは、2-メルカプトエタノール(2-ME)が極めて顕著に神経細胞死を抑制し、細胞生存率を高めることを見つけたので、ここに紹介したい(Ishii *et al.* *Neurosci. Lett.* 163:159-162, 1993)。

2. 研究の発端

私たちは、神経細胞の初代培養を用いて新規の神経栄養因子の探索という研究を行って来たが、幾つかの酵素が神経栄養因子活性をもっていることにも興味を持っていた。たとえば、エノラーゼやカタラーゼなどである。グルコース-6-リン酸イソメラーゼも栄養因子活性があるという報告(Mizrachi, *J. Neurosci. Res.* 23:217-224, 1989)を見て、私たちは、ある必要性からその追試実験を始めた。この酵素は市販のを用いた。早速、追試を行ったところ確かにこの酵素は栄養因

子活性を示した。しかし、この酵素は液状で市販されており、その溶媒の中に2-MEが入っていたので、コントロール実験として2-MEの影響を調べたところ、2-MEも顕著な栄養因子活性を示した。そこで、本格的に2-MEの栄養因子活性を研究した。

ところで、2-MEが免疫細胞の増殖や免疫機能の高進に効果のあることは、免疫学研究者の間では周知のことであり、その作用機構も詳しく研究されてきた。すなわち、2-MEは培養液中のシスチンと結合してシスチンの細胞内取り込みを促進すること、ついで、細胞内シスチン含量の増加にともないグルタチオン合成がすすみ、その含量も増加する。グルタチオンは細胞内の酸化還元調節に重要な働きのあることが知られている。

3. 神経細胞の生存と分化に対する2-MEの効果

培養は次のように行った。妊娠マウス16日目の胎児脳から大脳皮質と線条体を取り出し、二価イオンを含まないPBS中で加温処理した後、細胞を単離した。ついで、ポリリジンでコートした培養皿にまいて、培養した。培養液は特別に調製した無血清培地である。

このような培養条件下で培養を開始すると、神経細胞の生存率は3,4日後に急激に減少する(図1)。ところが、無血清培地にBIM細胞やVR-2g細胞の培養上清液(神経栄養因子が分泌されている)を添加して細胞を培養すると、神経細胞の生存率は3,4倍(図1)、場合によっては10倍以上も増加する。神経栄養因子の判定は、神経細胞の生存の支持、ならびに分化の促進(神経突起の伸展)という二つのカテゴリーにより行われるが、確かに、上述の培養上清液は細胞分化に対しても顕著な効果を示した。しかし、培養上清液を加えた培養液を用いても、培養開始後7日目頃に

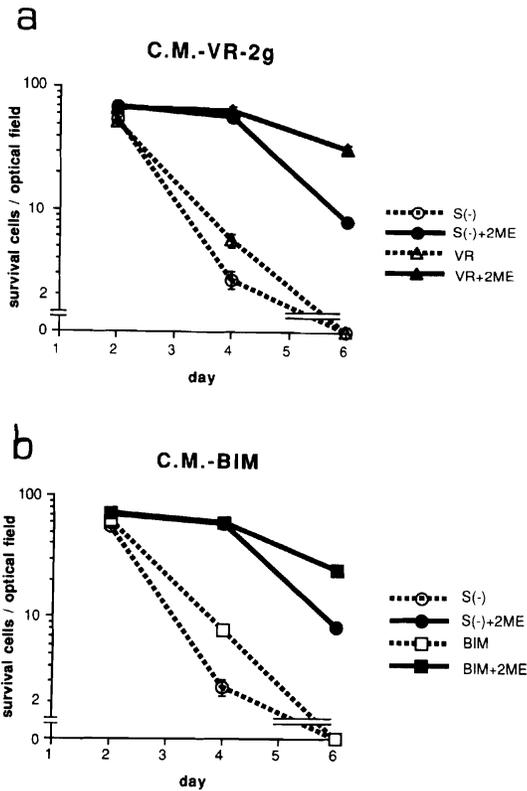


図1 神経細胞の生存に対する培養上清液および2-MEの効果

16日目マウス胎児脳から大脳皮質と線条体を摘出し、PBSで洗った後、ピペettingにより細胞を単離した。細胞は種々の培養液中で培養した。特別に調製した無血清培養液をベースに、そこへVR-2g細胞の培養上清液(C.M.-VR-2g)(a)、あるいはBIM細胞の培養上清液(C.M.-BIM)(b)を単独で、あるいは2-ME(2-メルカプトエタノール)(10 μ M)と同時に加えた。培養後日数を追って、生存細胞数をかぞえた。

は神経細胞の生存率は急激に減少する(図1)。

ところが、無血清培地に2-MEを添加すると、驚いたことに、培養開始後4日たっても神経細胞の生存率は減少しなかった(図1)。さらに、無血清培地に培養上清液と2-MEとを同時に加えると、培養開始後6日たっても神経細胞の生存率は大きく減少しなかった(図1)。以上の実験は、大脳皮質と線条体の細胞を混合して行ったが、それぞれ単独で行っても同じような実験結果が得られた(図2, 3)。

次に、神経細胞の分化に対する2-MEの効果

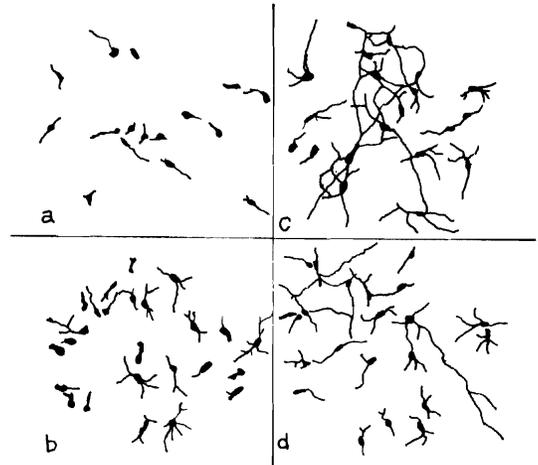


図2 線条体の神経細胞における神経突起伸展の誘導

16日目のマウス胎児から線条体を取り出し、細胞を単離した後、培養した。(a)無血清培地、(b)2-MEを添加した培地、(c)BIM細胞の培養上清液と2-MEを添加した培地、(d)VR-2g細胞の培養上清液と2-MEを加えた培地。2-MEは神経細胞の生存率には効果があるが、神経突起の伸展には誘導効果がないことに注意。

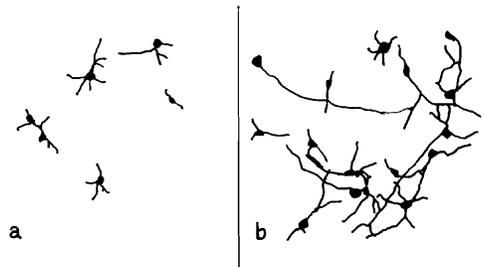


図3 大脳皮質の神経細胞の突起伸展に対する2-MEの効果

18日目のマウス胎児脳の大脳皮質細胞を培養した。(a)無血清培地、(b)2-MEを添加した培地。神経突起の形成が誘導されている。

調べたところ、線条体神経細胞に対しては、2-MEは単独では分化促進効果はなかったが(図2b)、2-MEを培養上清液(神経栄養因子)と同時に加えると神経細胞の分化に対して相乗効果を示した(図2c, d)。これに反して、大脳皮質神経細胞に対しては2-MEは単独で分化促進効果を示し(図3b)、ここへ神経栄養因子を加えると細胞分化は加算的に増加した。2-ME単独の時、細胞分化促進効果が線条体神経細胞と大脳皮質神経細胞とで

異なることは、たいへん興味深い。この理由はまだ不明であるが、両神経組織の発生分化時期の相違が関係しているかも知れない。

4. 今後の展望

2-ME の神経細胞の生存と分化に対する極めて顕著な効果は、予想もしていなかった出来事である。このような効果が脳の各部域における神経細胞においても普遍的に見られることは、私たちとほぼ同時に他の研究室からも同じような研究結果が発表されたことから明らかである。もっとも、彼らは、2-ME は神経細胞の生存を支持するだけで、細胞の形態変化、すなわち、細胞分化には効果がなかったと報告している。この点は私たちの実験結果と異なるが、その理由は、彼らの論文を見た限りでは、実験にもちいた培養条件の相違のためであるとおもわれる。彼らは、高い細胞密度

で細胞を培養したが、私たちは低い細胞密度で培養したために、個々の細胞の形態変化を感度も精度も高く測定できたのである。

それでは、2-ME の作用の分子機構はどんなものか。免疫細胞に対する効果と同じような仕組みで働いているのだろうか。この問題は今後の研究課題である。ここで強調したいことは、従来は、神経細胞の初代培養法の改善は半ば経験主義的に行われてきたが、今後は、神経細胞の細胞生物学的特質を解明しながら、研究目的に応じて培養法を改良していくことが可能であるということである。逆に言えば、従来は、神経細胞の初代培養の用途は限られていたが、今後は、神経科学における多くの問題を初代培養系で細胞生物学的・分子生物学的に研究することが可能になったと言えよう。