

神経細胞の雑種形成

石井 一 宏

京都大学ウイルス研究所細胞生物学部門

1. はじめに

近年、神経機能を細胞培養系で再現する方法論を開発しようという気運が高まってきた。この気運は、神経科学の研究に分子生物学や神経工学の手法を導入し、そして駆使するための一つのステップとして重要であるという認識に基づいている。神経科学においては細胞培養系をもちいた研究は、三つの観点から行われつつある。(1) 神経細胞の初代培養と神経栄養因子の研究、(2) 神経回路の形成の誘導——初代培養した神経細胞ならびに脳組織の薄片における電気生理学的研究も含まれる、(3) 神経系細胞の培養株の樹立、の三分野である。本稿では、第三の神経細胞の培養株について見て行こう。

2. 培養細胞株の樹立の方法と意義

神経細胞の培養系においても、その培養株の樹立の方法は他の種類の細胞の場合と変わりはない。その方法は三通り知られている。(1) 神経系の腫瘍組織の培養。この方法は既に多くの細胞株を樹立している。(2) 胎児あるいは若年動物由来神経細胞を初代培養し、そこへ細胞の不老化をもたらすガン遺伝子 (Immortalizing Genes) を細胞移入する方法。(3) 細胞融合法による雑種細胞の形成。この三通りの方法は、当然予想されるようにそれぞれ長所と短所を合わせもっており、細胞の特性や研究の目的に応じて使い分ける必要がある。具体的な話はそれぞれの箇所述べることにしよう。

それでは、培養細胞株を樹立したり、それを用いて研究することはどんな利点があるのだろうか。まず、発生生物学的には次のような利点が考えられる。発生過程における細胞分化の様子は細胞系譜の作製により把握されているが、幹細胞を培養し、さらには株化できれば、その細胞分化の様子

を細胞生物学的・分子生物学的によりよく理解することができる。さらに、神経系の発生過程における細胞相互作用に関する分子生物学的研究がやりやすくなる。神経栄養因子の研究がその好例の一つである。第二に、どのような研究分野においても、同じ性質を持った細胞を大量に扱えることは生化学的・分子生物学的研究にとってたいへん好都合である。第三に、脳における記憶の細胞生物学的・分子生物学的理解は、記憶現象を細胞培養系において解析することにより初めて可能になるのではないと思われる。

3. 腫瘍組織由来培養細胞株

一般に、腫瘍組織の細胞を培養すると株化しやすい。神経系では神経芽細胞腫から多くの培養細胞株が樹立されている。

ラットやマウスなど実験動物を用いた場合は、神経腫瘍は自然発生ガンだけではなく、動物に発ガン剤を注入し人工的に腫瘍をつくらせ、その腫瘍をもちいて培養細胞株を樹立することも行われている。B103 (Schubert et al., 1974) や RT-4 AC (Droms and Sueoka, 1987) などがある。あるいは、ガン遺伝子を組み込んだレトロウイルスを受精卵に注入し、トランスゲニック動物 (遺伝子導入動物) をつくり、その胎児、あるいは出生後成体になって発生してくる腫瘍を利用する方法も知られている (マウス RT-1) (Hamman et al., 1990)。

ヒトの場合はもちろん、自然発生的に形成された神経芽腫をもちいて培養株を樹立している。IMR-32 (Tumilowicz et al., 1970), SK-N-DZ, GOTO, RT-LN-1 (Horii et al., 1989) など多くの培養株が知られている。

ここで、動物に実験的に腫瘍を作らせ、その腫瘍から神経性細胞培養株を樹立した例を紹介しよ

う。それはラット神経様細胞培養株 B103である (Schubert et al., 1974)。妊娠15日目の BDIX ラットにニトロソエチールウレア (NEU) を注射したところ、その新生児は出生後4ヶ月から10ヶ月の間に約半数の個体が神経異常症状をあらわした。それら個体を解剖学的に調べると、93%のものに中枢神経系に腫瘍が見つかった。そこで、その腫瘍を取り出し、培養した。培養方法は簡単で、まず腫瘍組織を細かく切り刻み、細胞を単離し、組織の薄片とともに培養皿にまいて、20%の牛胎児血清を含む Eagle MEM 培養液中で培養した。その後、クローニング・カルチャーをして、多くのクローンを分離した。B103細胞はその内の一つのクローンである。著者らは、分離した各クローンが神経性細胞であるかどうかをいろいろな方法で調べている。電気生理学的性質、すなわち電気的興奮膜をもっていたクローンは B35, B50, B65, B103, B104の五つのクローンのみであった。B103細胞はのちほど述べるように筆者らの研究にも使われた。

なお、神経細胞の分化のモデルとしてよく使われている PC12細胞はラット副腎髄質褐色細胞腫から分離された培養株である (Greene and Tischler, 1976)。

4. 不死化遺伝子の利用

発生胚にしる成体の組織にしる、これらの細胞を初代培養するとたいていの場合は何回かの細胞分裂を行うが、継代培養して行くと、次第に増殖性が低下し、ついには細胞は死滅する。この現象を細胞の加齢と呼び、増殖性の低下した細胞を老化細胞と呼んでいる。

実際には、この老化現象を切り抜けて半永久的に増殖能を獲得する場合がある。このような現象を細胞の不死化と呼び、こうして得られた細胞集団を細胞株と呼んでいる。線維芽細胞はその代表的な例の一つである。

しかし、正常組織の細胞を培養して、そこから細胞株を得るにはその頻度が極めて低く、たいへん効率が悪いのが現状である。そこで、ガン遺伝子をもちいる方法が開発された。ガン遺伝子を組換え体レトロウイルスに挿入し、そのウイルスを細

胞に感染させるとウイルスゲノムは細胞の染色体に組み込まれ、細胞の遺伝子として転写される。そのような細胞はもはや老化現象はおこさず、細胞株として半永久的に増殖し続けることができる。そのようなガン遺伝子是不死化遺伝子と呼ばれている。不死化遺伝子には *myc*, SV40 T-抗原, ポリオーマウイルス T-抗原, パピローマウイルス E7などが知られている。このガン遺伝子がどのような仕組みで細胞の不死化をもたらすのであるかは、まだ十分に理解されていない。ここで特筆すべきことは、この方法が有効なのは、少なくとも一回は細胞分裂できる細胞に限られることである。レトロウイルス・ゲノムが細胞の染色体に組み込まれるためにはこの条件が必要なのである。

ところで、腫瘍細胞が培養系において細胞株になりやすいという傾向は、たいていの腫瘍細胞ではガン遺伝子が発現しているという事実と関係があると推定されている。

近年、神経系の細胞にもこの方法が採用され始めた。まだ、報告例は少ないが、神経細胞や幹細胞やグリア細胞の培養株がとられている (表1)。その具体例について見ていこう (Evrard et al., 1990)。

出生後1日目のマウスの脳の線状体を取りだし、細胞を単離して培養した。培養液はダルベッコの MEM に10%牛胎児血清を加えたものである。

表1 不死化遺伝子の細胞内移入による培養細胞株の樹立

TRANSFER OF IMMORTALIZING GENES	
(a)	Neuronal Cell Lines
	NR Cells . E7-Chicken Neuroretina/v-myc (Casalbore et al., 1987)
	2.3D : E10-Mouse Mesencephalon/c-myc (Bartlett et al., 1988)
	RT-1 : Retinal Tumor from Transgenic Mouse (SV40 T gene) (Hamman et al., 1990)
(b)	Glio-Neuronal Cell Lines
	ST15A/M15B : PN2-Rat Cerebellum/SV40/v-myc (Fredericksen et al., 1988)
	Str.SVLT.3.8 : PN1-Mouse Striatum/SV40 T (Evrard et al., 1990)
(c)	Glial Cell Lines
	A7 : Newborn Rat Optic Nerve/Sv40 T (Geller and Dubois-Dalcq, 1988)
	C.L.T.T.1.1 : E18 Transgenic Mouse Brain Cortex/ Polyoma T (Galiana et al., 1990)

初代培養細胞に不死化遺伝子を導入すると、神経細胞のみならずグリア細胞 (神経膠細胞) や神経系前駆細胞なども樹立される。ここでは、そのような細胞株の数例を紹介した。

細胞を1日間培養後、SV40-Large T 遺伝子をもつ組換えレトロウイルスを感染させる。培養液を交換後、培養を続けた。この際、培養液にはネオマイシン誘導体の一つである G418を入れておく。組換え体 DNA にはネオマイシン耐性遺伝子が入っているため、この DNA をもつ細胞は G418含有培養液中で増殖できるが、この DNA をもたない細胞は死滅する。かくして、不死化遺伝子をもった細胞だけが増殖してコロニーを形成する。分離したクローンの一つを Str. SVLT. 3.8と名づけた。

この細胞は分化能に関して興味深い性質を示した。牛胎児血清を含む培養液中で培養した時、細胞密度が飽和に達すると、この細胞はアストロサイトに分化した。ところが、無血清培地で培養すると、神経細胞に分化したのである。以上の結果は、この細胞が神経細胞とグリア細胞との前駆細胞である事を示しており、しかも、細胞分裂能のある前駆細胞が出生後1日目の線状体にも存在することが明らかにされたのである。

5. 雑種細胞の形成

ウイルスあるいはポリエチレングリコールをもちいて細胞融合を誘導し、そこから雑種細胞を分離する方法は、モノクローナル抗体の産生やヒト染色体のマッピングにおいて多大な貢献を果たした。

この方法が神経系細胞の培養株の樹立に利用されつつある。この方法の利点は幾つかあげられるが、最も興味深い点は、細胞分裂能を持っていない細胞でも培養株として樹立できる可能性があることである。もちろん、この場合その細胞のいくつかの特性だけを持った雑種細胞が得られるわけである。第二に、細胞融合にもちいる細胞数が少ない場合でも、目的とする雑種細胞が得られる可能性が高いこと。第三に、比較的短期間（20—30日程度）で雑種細胞がえられることなどである。

細胞の組合せとしては、三通り考えられる。(1) 二種類の培養細胞株のあいだでの細胞融合、(2) 培養細胞株×初代培養の細胞（あるいは神経組織から細胞を単離後ただちに用いる）、(3) 培養細胞株×記憶細胞。このような細胞の組合せの意図について簡単に説明したい。

第一の組合せは、腫瘍細胞が細胞融合したのち雑種細胞になると、その腫瘍性が喪失したり減少する場合があるという現象、すなわち腫瘍細胞の正常化現象を利用しようと言うのである。このような雑種細胞が得られると、その細胞が薬品処理などにより細胞分化した時、分化形質の発現が促進されたり、長期間安定した状態が維持されることが期待される。後程述べる BIM 細胞 (Ishii et al., 1990) はこのような性質を示した。Nirenberg らの NG108-15細胞もこの組合せの一例であり、マウス神経芽腫由来培養細胞株 N18TG-2とラットグリオーマ細胞とから作られた雑種細胞である(1983年に総説あり)。

第二と第三の組合せは同じように見えるが、第二の場合は細胞分裂能を持っている神経細胞（したがって、主として胎児脳の神経細胞である）についてであり、第三の場合は分裂能を持たない神経細胞の場合を考えている。もっとも、実際には初代培養細胞で融合した細胞が増殖能を持っていたかどうかを見分けることは難しい (Platica et al., 1983)。第三の場合、特に、脳の記憶細胞（細胞分裂能を持っていないと考えられている）が培養細胞株と融合し、その後細胞分裂を行って雑種細胞を形成すれば、そしてその雑種細胞が記憶に関する細胞生理学的・分子生物学的諸性質を発現するならば、脳の記憶現象を細胞培養系で研究するすばらしい実験系が得られることが期待される。

6. BIM 細胞について

ここで、私たちの研究について簡単に紹介したい。BIM 細胞は、ヒト神経芽腫細胞とラット神経様細胞とを融合させて得られた雑種細胞である。両親細胞ともに腫瘍性細胞であるが、その雑種細胞 BIM は部分的に正常細胞の性質を獲得した。BIM 細胞は db-cAMP に反応して細胞分化を行い、細胞体は丸くなり、長い突起を伸展させる。この反応は早く、薬品投与後30分に細胞の形態変化を顕微鏡下で観察できる。その後、18時間位で形態学的には細胞分化は完了する。このような性質をもつ BIM 細胞についてもう少し詳しく説明したい。

(a) チミジン要求細胞の樹立

雑種形成においては、雑種細胞だけが生き残り、両親細胞が死滅する選択培地が使われる。一般に、ヒト細胞はウアバインに対して非常に感受性が高く、ラットやマウス細胞はヒト細胞よりも100倍から1,000倍も感受性が低い。そこで、親細胞の一つIMR-32はウアバインで選択的に死滅させられる。もう一つの親細胞 B103細胞はそのような選択に役立つマーカーを持っていないので、B103細胞からチミジン要求株を作った。その細胞を B3T 細胞と呼んだ (Ishii, 1990)。B3T 細胞はピリミジン生合成系の酵素の一つ、TMP 合成酵素 (TS) (図 1) に変異を起こしており、その酵素活性が極めて低いのであると推測されている。そこで、B3T 細胞は TMP 欠損を起こし、DNA 合成が停止し、細胞増殖ができなくて、ついには死滅する。チミジン要求株の分離の方法についてはここでは省略したい。

(b) 雑種形成

B3T 細胞と IMR-32細胞とをポリエチレングリコール (PEG) 1500 (BDH) を用いて融合させた。その後、細胞を選択培地中で17日間培養した。八つのコロニーが得られ、その内の一つを BIM と

名づけた (Ishii et al., 1990)。

(c) BIM 細胞

BIM 細胞は平均して156本の染色体を持っていた。詳しい核型分析はまだ行っていないが、ヒト染色体 # 1 と 18 は容易に同定できた。IMR-32細胞では、染色体 # 1 にはガン遺伝子 N-myc の座位があり、# 18 には TS 遺伝子の座位があることが知られている。正常ヒト細胞では、N-myc 遺伝子は染色体 # 2 に座位しているが、神経芽腫細胞では N-myc 遺伝子に遺伝子増幅が起こり、かつ染色体 # 1 に転座したのである (Shiloh et al., 1985)。

興味深いことに、BIM 細胞は増殖して、細胞密度が飽和状態に達すると、増殖を停止して休止期に入った。そして、同時に神経突起が伸展した。この現象は、BIM 細胞が正常細胞の性質を獲得したことを示している。親細胞である B3T や IMR-32はこのような性質を示さない。しかし、BIM 細胞は完全に正常細胞に変化したわけではない。寒天培養するとコロニーを作ったのである (図 2)。この性質は腫瘍細胞のものであり、正常細胞は寒天中では、すなわち細胞の形が円形の時には増殖できない。したがって、BIM 細胞は部分的に正常細胞の性質を獲得したわけである。

BIM 細胞は環状 AMP に関する薬品に反応し

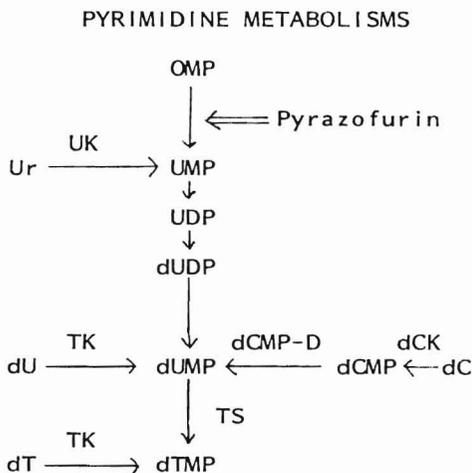


図 1 ピリミジン生合成系 (一部)

略号; UK: ウリジン・キナーゼ, TK: チミジン・キナーゼ, dCMP-D: dCMP-デアミナーゼ, TS: TMP-合成酵素, dCK: デオキシシチジン・キナーゼ。ピラゾフリンは OMP-デカルボキシラーゼの阻害剤である。

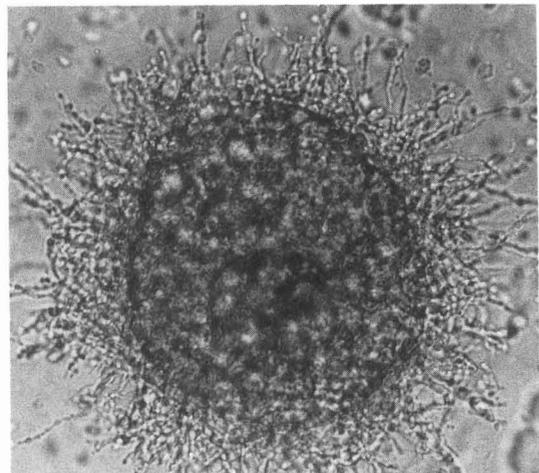


図 2 BIM 細胞のコロニー

BIM 細胞を 1.2% メチルセルローズ培地 (寒天培地でも良い) 中で 18 日間培養した。細胞増殖によりコロニーを作り、その後コロニーから神経突起が伸展した。

表2 BIM細胞の分化の誘導

INDUCTION OF DIFFERENTIATION IN BIM CELLS WITH VARIOUS REAGENTS		
Reagents	Concentration	Effects
none		-
db-cAMP	1mM	+++
cAMP	1mM	-
ib-mX	0.1mM	±
cAMP+ib-mX	1mM/0.1mM	+++
Forskolin	10mM	+++
H7	50μM	+++
A23187	1μM	++
TPA	0.1μg/ml	+/-
Retinoic Acid	1μM	-
NGF	50ng/ml	-

細胞を2日間培養し、そこへ薬品を投与した。その後1-3日目に観察した。細胞分化の判定は、細胞体の球形化および神経突起の伸展により行った。-：無反応、+、++、+++：反応の程度の大きさを表す。(略号) db-cAMP：dibutyryl-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate, ib-mX：isobutyl-methylxanthine.

て細胞分化する(表2と図3)。この反応は早く、薬品処理後30分に細胞の形態変化の開始を観察できる。したがって、この雑種細胞は細胞分化の研究に大いに役立つものと思われる。

たとえば、BIM細胞をdb-cAMPで処理すると、ガン遺伝子c-fosのmRNAレベルが一過性に増加した。薬品処理後30分に増加し始め、60分後にピークとなる(Adachi et al., 1991)。さらに、タンパクのリン酸化を調べた。神経細胞は細胞骨格の一つ、ニューロフィラメント(NF)を持っているが、3種のサブユニットの内210Kにdb-cAMP処理後30分にピークとなる一過性のリン酸化が起こった。210K-NFは神経突起の伸展時に起こるチュブリンの会合に関係があることが知られており、この点からもNFのリン酸化現象は興味深い(Adachi et al., 1991)。

BIM細胞は神経栄養因子を産生していることが、鶏やラットの脳の神経細胞をもちいたアッセイ法により明らかにされた。この点は、今後さらに研究が進めば、また改めて御紹介したい。

7. おわりに

ガンの研究や免疫学は、細胞培養系の導入が可

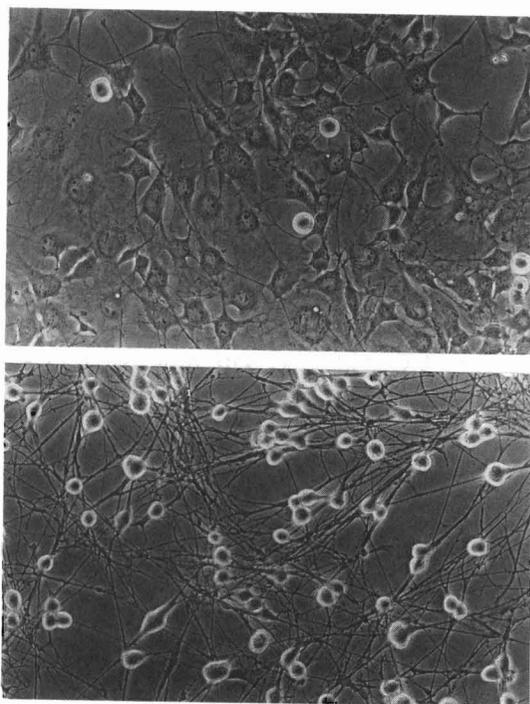


図3 BIM細胞の分化
細胞を2日間培養後db-cAMP(1mM)を投与し、その1日後に観察した。(上図)無投与、(下図)薬品投与。細胞体は丸くなり、長い突起を形成している。

能になった時、その後飛躍的に研究が進展した。ガン細胞や免疫細胞を培養することにより細胞の性質の解明が容易になっただけでなく、ガン遺伝子の作用や免疫機能のアッセイが多様に行うことが可能になったからである。

神経科学においてもこのことが可能になれば、脳の研究は飛躍的に発展することが期待される。神経栄養因子の研究にしろ神経回路の研究にしろ、これらの研究はまだ始まったばかりであり、さらには脳の働きの内でも最も主要なものの一つである記憶現象の分子生物学的研究は、細胞培養系において記憶現象のアッセイ法が開発されることにより飛躍的に進むものと思われる。

謝 辞

第20回岡山実験動物研究会における講演ならびにその会報への執筆の機会を賜った岡山大学農学部猪 貴義先生ならびに佐藤勝紀先生にお礼申

上げます。

参考文献

- 1) Adachi, Y. et al. (in preparation) 1991.
- 2) Bartlet, P. F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 3255—3259, 1988.
- 3) Casalbore, P. et al. Nature 326 : 188—190, 1987.
- 4) Droms, K. and Sueoka, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 1309—1313, 1987.
- 5) Evrard, C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 3062—3066, 1990.
- 6) Frederiksen, K. et al. Neuron 1 : 439—448, 1988.
- 7) Galiana, E. et al. JJ. Neurosci. Res. 26 : 269—277, 1990.
- 8) Geller, H. M. and Dubois-Dalcq, M. JJ. Cell Biol. 107 : 1977—1986, 1988.
- 9) Greene, L. A. and Tischler, A. S. Proc. Natl. Aca. Sci. USA 73 : 2424—2428, 1976.
- 10) Hammang, J. P. et al. Neuron 4 : 775—782, 1990.
- 11) Horii, Y. et al. Int. J. Cancer 43 : 305—309, 1989.
- 12) Ishii, K. Cell Struct. Funct. 15 : 93—97, 1990.
- 13) Ishii, K. et al. J. Cell. Physiol. 143 : 569—576, 1990.
- 14) Nirenberg, M. et al. Cold Spring Harb. Symp. Quantit. Biol. 48 : 707—715, 1983.
- 15) Platca et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3499—3503, 1985.
- 16) Schubert, D. et al. Nature 249 : 224—227, 1974.
- 17) Shiloh, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3761—3765, 1985.
- 18) Tumilowicz, J. J. et al. Cancer Res. 30 : 2110—2118, 1970.