

PC-12 細胞を用いた凝集 Amyloid β protein($A\beta_{1-42}$)の細胞毒性と
特異的遺伝子の発現による解析

日本生産工(院) ○大田 貴紀 中村 紘士 清水 武則
日本生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

1. 緒言

現在、日本の老年人口（65 歳以上）が総人口に占める割合は、2010 年の 23.1 %から上昇を続けて、2045 年には 38.2 %に達するとされている。認知症高齢者数は、2010 年で約 200 万人、2045 年には、約 400 万人となると予測されている。高齢化が進むにつれて患者が益々増加するため、認知症の早期発見および早期治療が求められており、認知症に関する研究が行われている。

Alzheimer's disease(AD)患者は、老人斑と神経原線維変化が脳の組織中に見られる特徴をもち、老人斑は、AD 発症の最も早期に現れ、主要構成成分の $A\beta$ の沈着によって生じる。更に $A\beta$ が脳内で蓄積することにより、神経細胞が壊死し、AD が発症すると考えられている。近年、脳内で生成される $A\beta$ について研究され、AD 患者は $A\beta_{1-42}$ の比率が高いことが明らかとなっている。 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ より凝集しやすく数分子から数十分子が会合し、強い神経毒性を持つといわれているオリゴマー状の繊維構造を形成すると報告している¹⁾。

近年までの AD に関する研究では、 $A\beta$ の凝集や毒性などについての報告はされているが、 $A\beta$ が作用する特異的遺伝子の発現に関する報告が少ない。よって自身の研究では、Nerve Growth Factor(NGF)を添加することにより神経細胞のように分化をされるとされているラット副腎髄質由来の褐色腫(PC-12)を用い

て³⁾、前述の解析を行うことを目的とする。

2. 実験方法

2.1 凝集 $A\beta_{1-42}$ の作製および確認

2.0 mg/ml $A\beta_{1-42}$ 水溶液 500 μ l を調整し、4℃で 30 分間インキュベートした。Dulbecco PBS で 2 倍希釈し、1.0 mg/ml に調整したものに反応促進性を持つ $A\beta_{16-20}$ を 10 mol 過剰(718 μ l)加え 37℃で 16 時間攪拌させた。また、 $A\beta_{16-20}$ 非添加状態も同様に攪拌し反応させた。凝集体の確認のために SDS-PAGE および Tht 法²⁾による分子量および構造の評価を行った。

2.2 PC-12 細胞の分化確認

Poly-L-Lysine コーティングした 96 well プレートに 200 μ l/well(3.0×10^4 cells/ml)の NGF ストック液(50 ng/ml)と PC-12 細胞の懸濁液を撒き、7 日間インキュベーターで培養した。Neurite Outgrowth Kit(Thermo Scientific)を用いて免疫染色を行い、ArrayScan(Cellomics)により、分化の確認を行った。

2.3 凝集 $A\beta_{1-42}$ の細胞毒性の確認

100 mm Tissue Culture Dish を用い実験 2.2 同様に PC-12 細胞を神経細胞に分化させた。分化後に凝集 $A\beta_{1-42}$ を添加し、細胞毒性を顕微鏡による目視により確認した。

3. 結果および考察

3.1 凝集 $A\beta_{1-42}$ の作製および確認

SDS-PAGE による分子量測定の結果を Fig. 1 に示す。この図より、単量体の分子量

が 4.5 kDa であることから 14 kDa, 21 kDa 付近のバンドが凝集体であると考えられる。チオフラビン T(Tht)法による結果が Fig. 2, Fig. 3 である。 $A\beta_{16-20}$ を添加していない $A\beta_{1-42}$ は経時変化による蛍光強度が増加していることにより、線維状であるということが考えられる。また、 $A\beta_{16-20}$ 添加したものは、経時変化による蛍光強度が減少していることにより、構造の異なる凝集体が作製できたと考えられる。

3.2 PC-12 細胞の分化確認

ArrayScan による観察の結果、樹状突起が確認できた。よって PC-12 細胞が神経細胞に分化したことがいえる。

3.3 凝集 $A\beta_{1-42}$ の細胞毒性の確認

凝集 $A\beta_{1-42}$ の細胞毒性の結果を Fig. 4 に示す。凝集 $A\beta_{1-42}$ を添加したものは、細胞が破壊されている様子がわかる。これにより、凝集 $A\beta_{1-42}$ による細胞毒性が確認できた。

4. 今後の展開

凝集 $A\beta_{1-42}$ による毒性が確認できたので特異的遺伝子の発現を解析して行いたい。また、同実験をラットの海馬神経細胞を用いて PC-12 細胞と比較検討を行いたい。

5. 参考文献

1) Gal Bitan et al, A Molecular Switch in Amyloid Assembly Met³⁵ and Amyloid β -Protein Oligomerization, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, (2003), 15359–15365

2) Inna Kuperstein, et al. Neurotoxicity of Alzheimer's disease $A\beta_{1-42}$ peptides is induced by small changes in the $A\beta_{1-42}$ to $A\beta_{1-40}$ ratio, *European Molecular Biology Organization*, **29**, (2010), 3408-3420

3) Young Il Cho, et al. Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, *Acta Biomaterialia*, **6**, (2010), 4457-4742

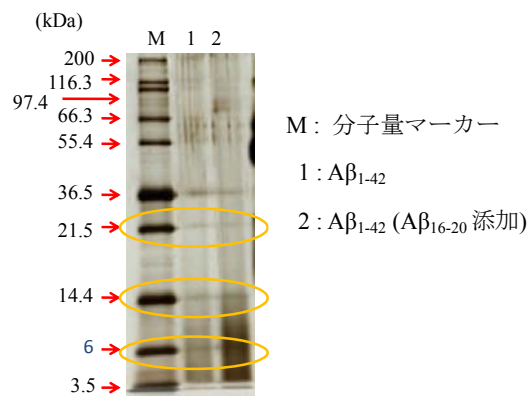


Fig. 1 SDS-PAGE による分子量の測定

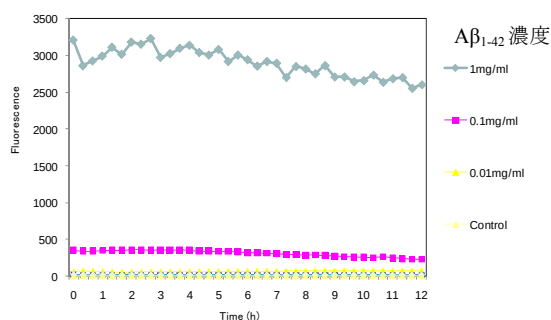


Fig. 2 Tht 法による $A\beta_{1-42}$ の蛍光強度変化($A\beta_{16-20}$ 未添加)

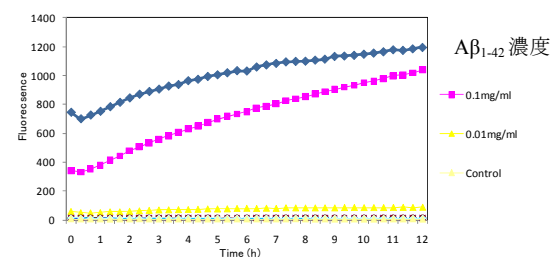


Fig. 3 Tht 法による $A\beta_{1-42}$ の蛍光強度変化($A\beta_{16-20}$ 添加)

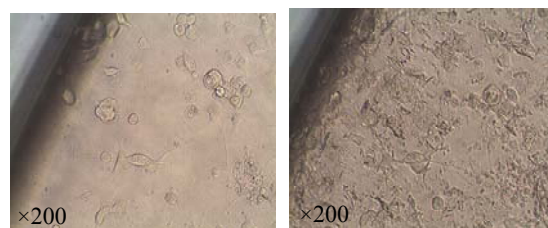


Fig. 4 細胞毒性の確認 凝集 $A\beta_{1-42}$ 未添加(左) 添加(右)