

凝集 A β_{1-42} による神経特異的遺伝子発現量の解析

日本生産工(院) ○大田 貴紀 清水 武則

日本生産工 吉宗 一晃 小森谷 友絵 野呂 知加子 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 β の沈着によって生じる。更にA β 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。A β_{1-42} はA β_{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 β の凝集や毒性などについての報告はされているが、A β 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すとされているラット副腎髄質由来の褐色腫(PC-12)およびラット海馬神経細胞を用いて、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 β_{1-42} の作製および確認

2.0 mg/ml A β_{1-42} 水溶液 500 μ l を調整し、4°C 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 β_{16-20} を 10 mol 過剰(718 μ l) 加え 37°C で 16 時間攪拌させた。また、A β_{16-20} 非添加状態も同様に攪拌し反応させた²⁾。凝集体の確認のためにチオフラビン T (ThT)法、Atomic Force Microscope (AFM)法による構造の評価を行った。

2.2 PC-12 細胞およびラット海馬神経細胞の画像による分化確認

Collagen コーティングした 96 well プレートに PC-12 細胞を 3.0×10^4 cells/well と 50 ng/ml NGF ストック液を播種して、7 日間培養した。Neurite Outgrowth Kit(Thermo Scientific)を用いて細胞核、生細胞を染色した。測定法は、特定の蛍光試薬で染色することにより、各 well 中の個々の細胞について蛍光強度より統計処理することができる ArrayScan(Cellomics)により、分化の確認を行った。ラットの胎児から摘出した海馬神経細胞を Poly-D-Lysin コーティングした 96 well プレートに 2.0×10^4 Cells/well になるように播種して培養をした。PC-12 細胞同様 ArrayScan により、分化の確認を行った。

Analysis of Neuron Specific Gene by Aggregate A β_{1-42}

Takanori OTA, Takenori SHIMIZU, Kazuaki YOSHIMUNE, Tomoe KOMORIYA Chikako NORO
and Hideki KOHNO

2.3 Real-Time RT-PCR による神経細胞の発現の確認

神経細胞に分化した PC-12 細胞およびラット海馬神経細胞は、神経特異的遺伝子により発現の確認を行った。

2.4 凝集 A β_{1-42} の細胞毒性試験の確認

実験 2.2 の 96 well プレートを用いて分化後、構造の異なる A β_{1-42} を添加した。細胞毒性試験は、Cell Viability Kits(Thermo Scientific)を用いて細胞核、生細胞、死細胞を染色した。ArrayScan により細胞毒性試験の解析を行った。また、神経細胞に凝集 A β_{1-42} を添加し、RNA を抽出して神経特異的遺伝子の発現を確認した。

3. 結果および考察

3.1 凝集 A β_{1-42} の作製および確認

ThT 法による結果では、A β_{16-20} を添加していない A β_{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 β_{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。また、AFM による画像解析では、A β_{16-20} を添加していない A β_{1-42} は繊維状の構造を有しており、A β_{16-20} 添加したものは球状の構造を確認した。これらにより線維状と球状凝集体の 2 種類の構造の A β_{1-42} を作製できた。

3.2 PC-12 細胞およびラット海馬神経細胞の画像による分化確認

ArrayScan による観察の結果、樹状突起が確認できた。よって PC-12 細胞およびラット海馬神経細胞が分化したことがいえる。

3.3 Real-Time RT-PCR による神経細胞の発現の確認

分化した PC-12 細胞では、NSE の発現を確認した(Fig. 1)。また、海馬神経細胞では、Nestin の発現を確認した。

3.4 凝集 A β_{1-42} の細胞毒性試験の確認

ラット海馬神経細胞に凝集 A β_{1-42} を添加した細胞毒性試験の結果を示す(Fig. 2)。凝集 A β_{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 β_{1-42} による細胞毒性が確認できた。

4. まとめ

凝集 A β_{1-42} が神経細胞に毒性を与えていることが確認できた。今後は、凝集 A β_{1-42} が障害を与える神経特異的遺伝子への発現量の解析を行う。

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) Minako Hoshi, et al. Spherical aggregates of β -amyloid(amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau proteinkinase1 /glycogen synthase kinase-3 β , PNAS, 100, (2003), 6370-6375

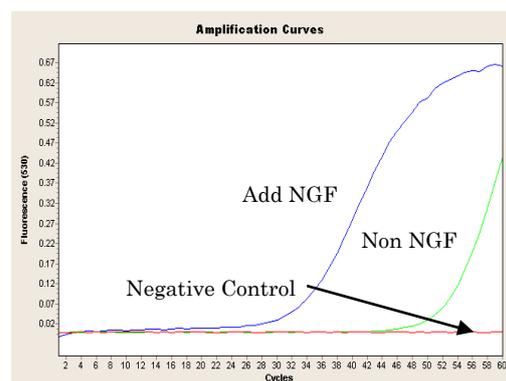


Fig. 1 Analysis of Neural-Specific Genes by Real-Time RT-PCR

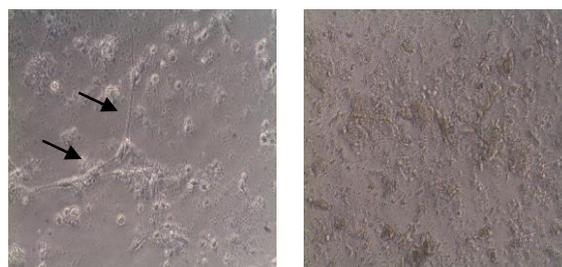


Fig. 2 Images of cytototoxicity in Rat Hippocampal Neurons