

神経系細胞の突起形成, 伸長の制御に関わる化合物の検索

申請代表者 上里 忠良 国立大学法人浜松医科大学医学部生化学第二講座 准教授

■背景・目的

神経細胞と筋肉細胞は相互依存の関係にあると思われる。例えば、筋萎縮性側索硬化症では、まず脊髄前根の萎縮が著しくおこる。運動性ニューロンが消失すると、その支配下にある骨格筋細胞も萎縮する。また、どの運動ニューロンがどの骨格筋に行くかは、前角にある運動ニューロンの位置と筋肉細胞の分泌する因子に依っていると考えられている。BMP(Bone morphogenetic protein) アンタゴニストである neurogenesis-1 が BMP による骨分化誘導作用を抑制することを証明する実験(文献1)で、我々は筋芽細胞が何らかの神経突起の伸長因子を分泌することを見出した。これらの因子は、現在精製中であるが、いくつかのニューロトロフィン(NGF, nerve growth factor, BDNF, brain derived neurotrophic factor, NT-3, neurotrophin -3 など)が含まれていると思われる。これらの因子は細胞の分化状態や、分泌前駆体のプロセッシングにより、その機能性が大きく変化する。分泌機構は複雑と思われるが、その制御に富山大学和漢医薬学総合研究所が開発された多くの生薬化合物、および生薬エキスが有効かどうか、また効果があるとしたら如何なる制御に関わるかを解析することが目的である。

■結果・考察

(1) 神経突起形成を促進する生薬エキス (E1 ~ E120)

1) 一次スクリーニング

まず C2C12 細胞(マウス筋芽細胞由来)を 24-well プレートに培養し、confluent になった状態にする。新しい培地 500 μ l に置き換えると同時に生薬(E1 ~ E120)を加え、~ 24h 培養する。生薬エキスセット(120種類)の場合、0.1mg/ml ~ 0.4mg/ml の濃度で加えた。細胞障害(細胞死)をまねかない濃度で行った。培養液を回収し、0.4 μ m メンブレンフィルターを通すか、またはエッペンチューブで遠心(15K rpm x 10min)して、上清のみを回収する。次にあらかじめ、前日に 24-well プレートに培養しておいた PC12D 細胞(ラット副腎髄質由来)の培地を上述回収した培養上清に置き換える。そして 18 ~ 24 時間の培養後、PC12D の神経突起形成を観察する。神経突起の形成は control(生薬無処理の培養上清を加えた場合)と比較して、それより突起形成の多いものをセレクトした。位相差顕微鏡による観察(図1A)と、NIH の ImageJ による画像解析により、突起数/細胞面積をプロットした。これらの実験データから一次スクリーニングとして、E11, E13, E29, E30, E38, E47, E48, E53, E54, E67, E73, E87, E90, E92, E94, E97, E108 の 17 種を拾いだし(図1B)、次のステップに進めた。

2) 二次スクリーニング

PC12D 細胞の突起形成を促進する原因として、第一に、C2C12 が、NGF, BDNF, NT-3 などニューロトロフィンを分泌すると考えられるからである(文献2)。実際、我々は C2C12 が confluent で少なくとも 10 日間は、これらの突起形成促進因子を分泌することを確認している。従って、一次スク

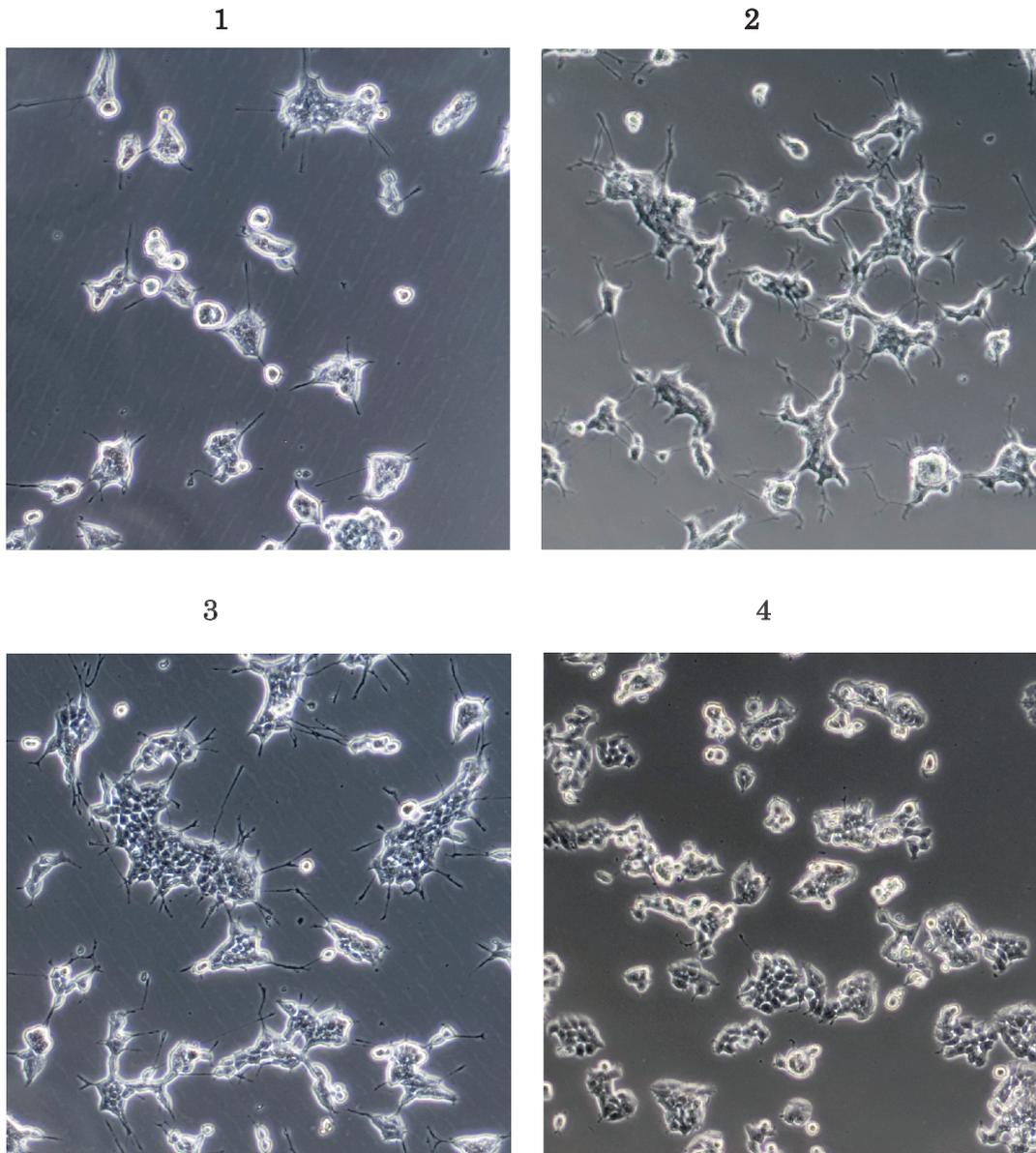


図 1 A

いくつかの生薬の効果を示した顕微鏡写真 1 : Control (生薬エキス無処理の C2C12 培養液を加えた PC12 細胞)。通常 C2C12 細胞は PC12 細胞の突起形成促進因子を分泌する。 2 : E11 を加えて培養した C2C12 細胞の培養液で培養した PC12 細胞。コントロールに比べて多数の突起形成が見られる。 3 : E29 を加えた C2C12 の培養液を加えたもの。 2 と同様にコントロールと比べて多数の突起がみられる。 4 : ネガティブな効果として E55 を加えて培養した C2C12 の培地を加えたもの。ほとんど突起の形成は観察されない。
(倍率 x 100, 詳細については結果. 考察を参考)

リーニングでセレクションされた 17 種の生薬エキスが、これらの突起形成因子の分泌にいかにか影響しているかを RT-PCR 法により調べた。まず 12-well プレートで、confluent の C2C12 細胞に、上述の一次スクリーニングで得られた生薬を 0.4mg/1ml の濃度で加え、一日培養した (E87,E94,E97 は濃度 0.1mg/ml で行った)。培養液を除き PBS で洗浄した後、ISOGEN II(ニッポンジーン)で totalRNA を抽出した。RT-PCR は QIAGEN One-Step RT-PCR kit を用いた。実験結果は、電気泳

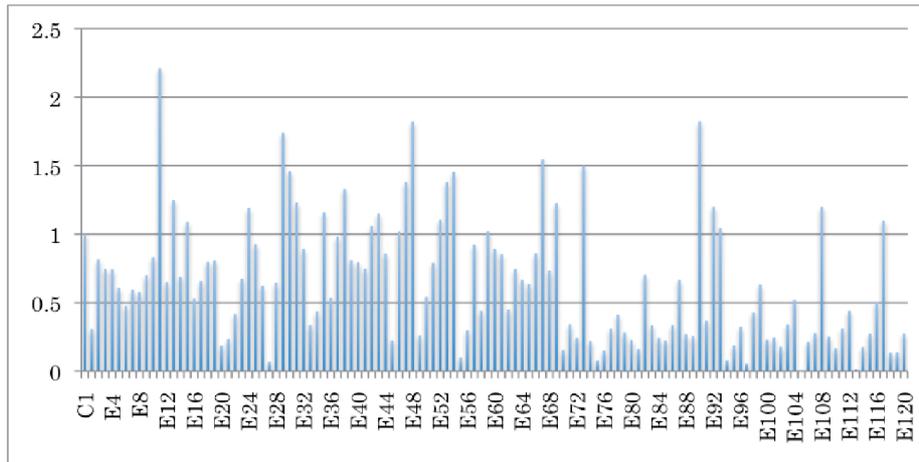


図 1B

PC12 細胞の突起形成における生薬の効果を半定量しグラフ化したもの（具体的な方法については結果, 考察を参考）。横軸の C1 は生薬無しのコントロール。縦軸はコントロールに対する相対的な値である。単純に画像中の全細胞の面積で、突起の数を割った値である。NIH の ImageJ を用いた。

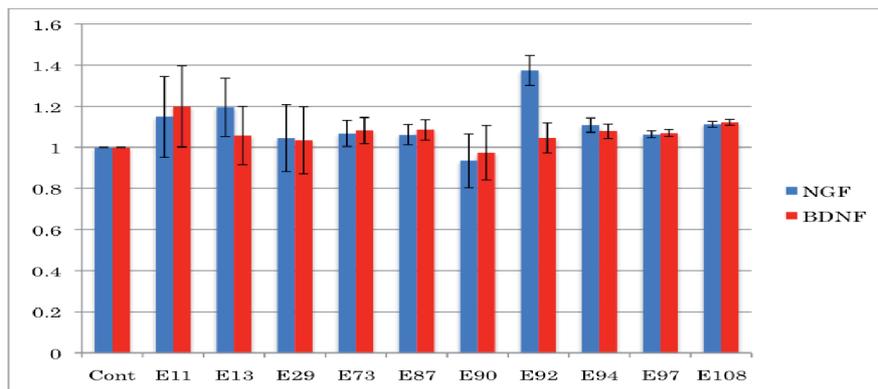


図 1C

C2C12 細胞の RT-PCR による NGF と BDNF の発現。横軸は各生薬エキスを加えたもので、Control は何も加えていない（具体的な方法については結果, 考察を参考）。縦軸は泳動後のバンドの濃さをコントロールを 1 とした場合の相対的値。解析は NIH の ImageJ を用いた。

動後各バンドを NIH ImageJ で解析しプロットした（図 1C）。使用した各プライマーは以下の通りである。

NGF: GCAGAACCGTACACAGATAGC, CAGCACTGTACCTCCTTGC

BDNF: GCAGGTTTCGAGAGGTCTGACG, GTAGTTCGGCATTGCGAGTTCC

NT-3: CTACTACGGCAACAGAGACGCTAC, GAAGTGTCTATTTCGTATCCAGCGC

Internal Standard として EF(elongation factor) を用いた。

対照実験の一つとして、一次スクリーニングの 17 種を直接 PC12D 細胞培地に加えて 24h 培養したが、全く突起の形成は見られなかった。また別の対照実験として、C2C12 の 24h 培養後に回収した上清に一次スクリーニング生薬を加え、それを PC12D 細胞に加えて反応をみた。多少突起形成が促進されるものも見られたが、ほとんどは効果がなかった。中でも E54 は筋芽細胞の分泌液と何らかの突起形成の促進を生じる相互作用を示唆した。これに関しては今後詳細に調べたいと考えている。

(2) 生薬由来化合物シリーズ (80 種) の実験

1) 一次スクリーニング

生薬エキスセットの実験と同様に一次スクリーニングを行った。96-well プレートを用いて、反応液 100 μ l の系で行った。濃度は 2 μ M, 20 μ M, 100 μ M で行った。まず 96-well プレートに C2C12 細胞を培養し、confluent になった状態で、各濃度の生薬化合物を加え、~24h 培養した。培養液を回収し、遠沈 (15K rpm x 10min) し、上清を回収した。そしてあらかじめ準備培養しておいた PC12D 細胞に加えて、神経突起形成を観察した。位相差顕微鏡写真から NIH の ImageJ を用いて神経突起数/全細胞面積の比率をプロットした。3 種類の濃度で行った結果で、ポジティブなもの (I-2, I-5, I-6, I-27, I-36, I-56, I-66, I-72, I-76) をセレクションした (図 2A)。

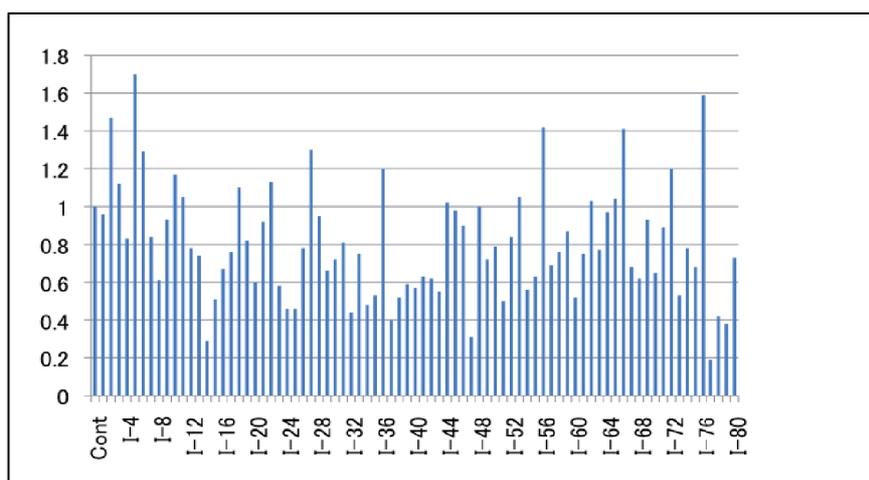


図 2A

PC12 細胞の突起形成における生薬由来化合物の効果を半定量しグラフ化したものである。横軸の Control は生薬無し。縦軸はコントロールに対する相対的な値である。単純に画像中の全細胞の面積で突起の数を割った値である。NIH の Image J を使用した。(詳細は本文を参考)

2) 二次スクリーニング

各化合物 (I-2, I-5, I-6, I-27, I-36, I-56, I-66, I-72, I-76) を C2C12 細胞に加えて、~24h 培養し、RNA を抽出した。そして生薬エキスの実験と同様に、NGF, BDNF, NT-3 の発現を調べ、その効果を調べた。試薬の量に限度があるため、12-well プレートで細胞を培養し、medium 1ml に対して 4 μ l の原液 (10mM) 加えた (最終濃度 40 μ M)。生薬エキスの実験同様に RNA 抽出と RT-PCR を行い、NIH ImageJ による解析を行った (図 2B)。I-5 と I-76 は細胞死が生じて RNA の回収ができなかった。

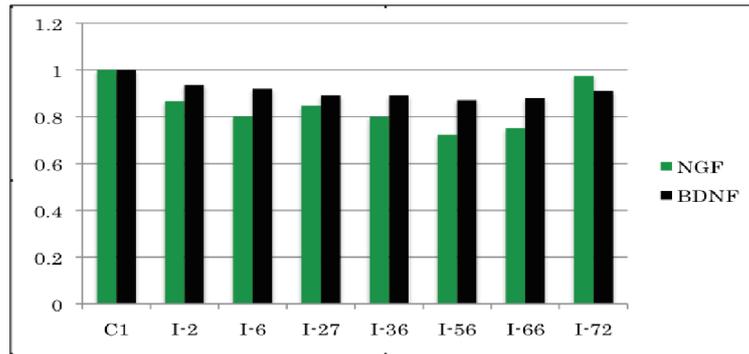


図 2 B

RT-PCRによるNGFとBDNFの発現。横軸は各生薬由来化合物を加えたもので、Control (C1)は何も加えていない。縦軸は泳動後のバンドの面積をコントロールを1とした場合の相対的値。解析はNIHのImageJを用いた(詳細は本文を参考)。

■結論

生薬エキスセット(E1~E120)の実験で、一次スクリーニングで得られた17種が、細胞障害(細胞死)を起こさず、神経突起形成にコントロールに対して同程度、あるいはそれ以上のポジティブな効果を示した。しかし、その分子的機構は必ずしも明白ではない。二次スクリーニングのRT-PCRの結果ではNGFの発現では、E11, E13, E92が少し高く、BDNFの発現ではE11, E108が多少高い値が得られた。NT-3の発現はバラツキや生薬間での変動が大きく、一定しないため結論を引き出すには至らなかった。NT-3の分泌制御は生薬種によって影響を受けやすいと思われる。NT-3に関してはさらに検討が必要である。全体的にこれらのニュートロフィンの分泌制御のバランスが神経突起形成に重要であると思われる。しかしニュートロフィンの生薬による分泌促進と突起形成との直接的相関性を明瞭に示すことはできなかった。これは突起形成にネガティブな生薬もRT-PCRの実験ではcontrolよりも高いものが存在したからである。とりあえず現時点では、一次、二次スクリーニングから、E11, E13, E29, E73, E87, E90, E92, E108を中心に、さらに他の神経突起形成に関与する因子(IGF-2など)のmRNA発現との関係性を調べる予定である。また生薬の組み合わせなどを含めて、臨床的に応用可能な生薬開発に進めて行きたい。

生薬由来化合物に関する実験(I-1~I-80)では、データの数、質ともに不十分なので、今のところ結論を出すには難しいが、一次スクリーニングしたすべての生薬化合物がNGF, BDNFの発現を抑制した。とくにBDNFの抑制が強い傾向にある。これは顕微鏡観察と大きな矛盾を示すことになった。今後適当な濃度の選択が必要と思われる。

■文献

1. Neurogenesis-1 differentially inhibits the osteoblastic differentiation by bone morphogenetic proteins in C2C12 cells. A. Chandra et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(2006) 786-791.
2. Evidence for the participation of nerve growth factor and its low-affinity receptor in the regulation of the myogenic program. K.Seidl et al. *J.Cellular physiology* 176:10-21(1998)