

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

再生治療に向けた神経系前駆細胞の移植細胞源としての 高品質保持と拡大への試み

福光秀文

1. 緒言

神経系前駆細胞 (neural progenitor cells; NPC) は、神経細胞の産生を介して、損傷などにより失われた神経機能を回復するため、難治性神経疾患の再生医療治療の移植用細胞として注目されている。NPC には自己複製能があるが有限であり、神経細胞への分化誘導能、特に機能再生の本体となる特定の神経細胞への分化誘導能が分裂回数を経るごとに著しく低下するため臨床応用への障害となっており、この神経細胞への分化誘導能を維持して NPC を増やす手法の開発が望まれている。

近年当教室では、FGF-2 の存在下で増殖中の神経系前駆細胞を BDNF で処理すると、FGF-2 除去後の神経細胞に分化する細胞の比率が増加しそのタイミングも早まることを見出している (Ito et al., 2003)。つまり、神経系前駆細胞を BDNF で処理すると、より多くの神経細胞を生成できるのではないかと考えられた。

そこで、本研究では特定の神経細胞を効率よく調製するためのプロトコルの確立を最終目標として、ニューロトロフィンのひとつである BDNF の神経系前駆細胞に対する作用とそのメカニズムの検討を行った。

2. 実験方法

胎生 14 日齢マウス大脳皮質より NPC を調製し、①:培養開始時から FGF-2 を含み BDNF を含まない基本培地で培養した群 (F)、②:培養開始時から BDNF と FGF-2 の両方を含む基本培地で培養した群 (F/B)、③:①の条件で 4 日間培養の後、BDNF を除去した基本培地に変更して培養を続けた群 (F/B→F) について細胞の性状を調べた。まず、一定期間ごとの細胞数の増加率を、次に免疫染色法を用いて細胞分化に伴って生じる神経細胞の比率を検討した。さらに、BrdU (5-bromo-deoxyuridine) 蓄積ラベル法により細胞周期の所要時間を調べ、PI/YO/hoechst を用いた死細胞染色法により、細胞の生存数と比率を求めた。

細胞数の増加: 神経系前駆細胞を FGF-2 存在下で長期間培養するとき、BDNF の共存によって細胞増加率が上昇した (Fig. 1)。BDNF の細胞増加作用は、細胞の特性の短期的変化に基づくのではなく、長期間の培養の過程を経て、細胞集団としての細胞の性質あるいは構成比率が徐々に変化させることによっておこると推定される。これは、(F/B→F) 群の増加率が顕著に低下することからも、この BDNF によって細胞数の増加した細胞集団は FGF-2 のみを含む培地で育った細胞集団とは性質を異にする可能性が示唆された。

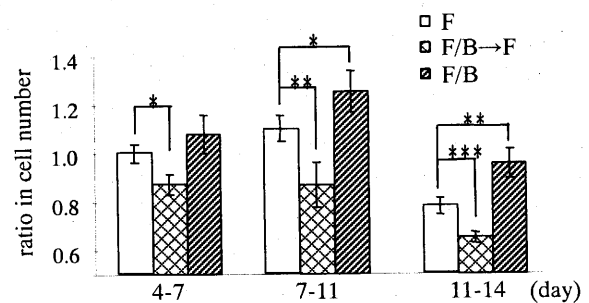


Fig.1 NPCs were cultured under the three conditions, and the cell number was calculated at culture day 7, 11 or 14, before each passage. The values are expressed as the mean \pm S.E. of fold-increase as considered the value of (F) of 4-7 day culture to be 1.0. Significance: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. (F). $n=6$.

神経細胞への分化率: BDNF によって増減する細胞の性質を調べるため各条件で培養した細胞を最終分化させ、神経細胞で特異的に発現するタンパク質 Tuj-1、アストロサイトで特異的に発現するフィラメントタンパク質 GFAP に対する一次抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。その結果、Tuj-1 陽性細胞の割合は (F/B) 群で有意に増加し、(F/B→F) 群では低下した。一方、GFAP 陽性細胞割合は (F/B) 群では有意に低下した。以上の結果より、増殖中の神経系前駆細胞に BDNF を作用させると、神経細胞に最終分化する細胞が増加し、BDNF を途中除去すると、神経細胞へ分化する細胞が減少することがわかった。した

がって、BDNF が、より早期に発生する神経系前駆細胞の性質を持つように変化させる可能性が示唆された。

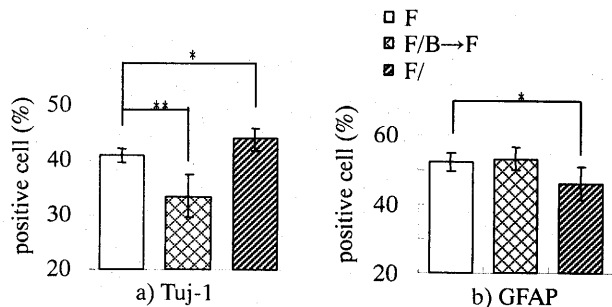


Fig.2 NPCs were replaced on poly-L-ornithine-coated dishes with FGF-2-free medium on the 11th day. The fixed cells were reacted with antibody against Tuj-1 (a), GFAP (b). The values of "a" or "b" are expressed as the mean \pm S.E. of % of the number of the cells with antigen-positive cells to the total cell number. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. (F). $n = 4-7$

細胞周期への影響： BDNF が神経系前駆細胞をより増殖能の高い未分化な細胞に変化させる可能性を検討するため BrdU 蓄積ラベル法 (Calegari et al., 2005) を行い、細胞増殖の指標となる細胞周期の各種パラメーター [細胞周期 S 期の長さ (T_s)、細胞周期全体の長さ (T_c)、分裂能を持った細胞の割合 (GF)] を培養条件ごとに算出した。その結果、(F/B) 群で T_c (特に T_s) が延長し、GF の低下もおきた。また、この作用はある程度の作用期間が必要であったため、神経系前駆細胞は BDNF による日数レベルの作用期間を経た後に、細胞周期 (特に S 期の所要時間) の長い細胞集団に変化することがわかった。

Culture condition	cell cycle parameters (hrs \pm SD)		GF (% \pm SD)
	T_s	T_c	
F	9.83 \pm 1.05	37.8 \pm 3.13	56.7 \pm 2.83
F/B→F	5.09 \pm 0.77**	29.8 \pm 1.89***	52.7 \pm 2.53
F/B	15.6 \pm 2.26***	41.2 \pm 0.91	46.0 \pm 1.63***

Table 1 T_c : total cell-cycle length. T_s : S phase length. GF : growth fraction. The values are expressed as the mean \pm S.E. of three determinations. Significance of differences from the values of control (F) was determined by ANOVA with Tukey's *post hoc* test for each condition. Significance: *** $p < 0.01$ vs. control (F). $n = 3$.

細胞生存への影響： 神経系前駆細胞を FGF-2 と BDNF の共存下 (F/B) で培養すると、細胞周期が短く増殖性の高い細胞集団ではなく、むしろ細胞周期が長く増殖性の低い細胞集団に変化することが分かった。したがって (F/B) 条件下で形成される細胞集団は、生存率が高くなっている可能性が考えられた。そこで、各培養条件における細胞死の頻度を、細胞膜非透過性のインターカレーター、PI/YO、を用いて解析した。その結果、BDNF 途中除去群

(F/B→F) の細胞では BDNF 除去 3 日以降で、対照群 (F) に比べて、PI/YO 陽性細胞率が有意に高くなり、細胞死が亢進することが分かった (Fig. 3)。逆に BDNF 添加群 (F/B) では、PI/YO 陽性細胞率が顕著に低下した。この作用は培養開始 5 日目から 7 日目にわたって観察された。以上の結果より、BDNF を同時に添加すると細胞周期の長い細胞集団が形成され、この細胞集団は、増殖性は低いものの BDNF に対する依存性が高く、BDNF による生存維持作用を受けていると考えられた。

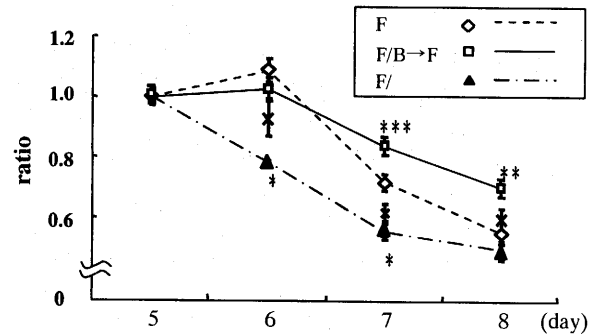


Fig.3 NPCs were cultured under the three different conditions. On the 4th culture day the cells were moved to coated dishes, and stained with membrane impermeable intercalaters, PI, YO and Hoechst at culture day 5,6,7, or 8. The number of the YO/PI-double-positive cells was counted as dying cells, and the ratio of the dying cells to total cells was calculated at each time point. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (F). $n = 3$.

4. 結論

今回の研究の結果から、神経系前駆細胞に BDNF を作用すると増殖しながら神経細胞に分化しやすく S 期の長い細胞集団が誘導されること、この細胞集団は BDNF によって生存が維持されることが明らかになった。しかしこの細胞が神経細胞のみを生み出す神経前駆細胞かどうか、については結論を出すことはできなかった。さらに、この細胞が完全に増殖能力を失うまでにどの程度の数の神経細胞を生み出すことができるのかという問題は、神経細胞に分化しやすい細胞を大量に調製するという再生医療への応用の観点からはきわめて重要であり、今後の検討課題としたい。

5. 参考文献

- Ito H et al. (2003) *J Neurosci Res* 71 : 648-658.
- Calegari F et al. (2005) *J Neurosci* 25 : 6533-6538.