

3. 動物細胞を用いた機能性評価

1) PC-12 細胞を用いた神経突起伸長測定法

筑波大学大学院生命環境科学研究科・北アフリカ研究センター

礪田 博子, 韓 峻奎

はじめに

PC-12 細胞(図 1)は, 1976 年 Greene らによってラット副腎髄質褐色腫より単離され株化された細胞である. その生存には神経成長因子(NGF)を必要としないが, NGF により増殖を停止し神経線維を伸長し, 交換神経節ニューロン様性質をもつようになるため, 神経分化モデルとして広く使われている. また, NGF による分化に伴い, アセチルコリンエステラーゼ(AchE)の活性が上昇することが知られているため, AchE 活性を神経分化の指標として用いた.

AchE は PC-12 細胞の神経分化のマーカーとして知られている. 神経筋接合部では, 神経伝達物質であるアセチルコリンがその受容体に結合することで, 神経伝達物質のゲートであるイオンチャネルが開くが, その後イオンチャネルはすみやかに閉口し, アセチルコリンは受容体から解離し, AchE によって分解される. このように, AchE はコリン作動性のシナプス伝達において重要な役割を担い, 神経細胞において多く発現している酵素である.

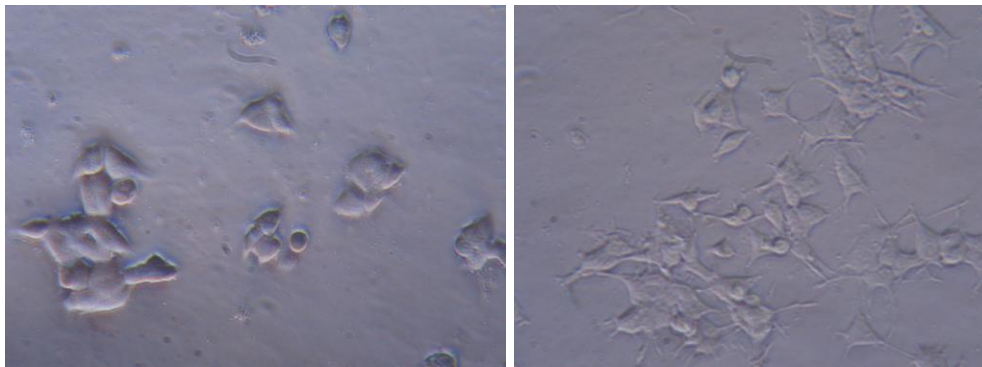


図 1 PC-12 の写真

準備するもの

1. 神経細胞分化確認実験
 - 1) 実験器具

- ・ PC-12 細胞 ; 理研 cell bank から購入した細胞株
- ・ CO₂ インキュベータ (37°C)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 滅菌メスピペット (5ml, 10ml) ; BD Falcon 社
- ・ 顕微鏡 ; Leica 社
- ・ T-25, T-75 細胞培養用フラスコ ; BD Falcon 社
- ・ デイッシュュ ; BD Falcon 社
- ・ ピペットエイド

2) 試薬

- ・ NGF ; 神経成長因子
- ・ 細胞培養用培地 (DMEM)
- ・ PBS (-)

2. AchE 活性測定実験

1) 実験器具

- ・ PC-12 細胞 ; 理研 cell bank から購入した細胞株
- ・ CO₂ インキュベータ (37°C)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 滅菌メスピペット (5ml, 10ml) ; BD Falcon 社
- ・ 顕微鏡 ; Leica 社
- ・ T-25, T-75 細胞培養用フラスコ ; BD Falcon 社
- ・ ピペットエイド
- ・ 96well 細胞培養マルチウェルプレート ; BD Falcon 社
- ・ 8, 12 チャンネルマルチピペットマン
- ・ 蛍光測定用プレートリーダー

2) 試薬

- ・ NGF ; 神経成長因子
- ・ 細胞培養用培地 (DMEM)
- ・ PBS (-)
- ・ Acetylcholine iodide ; 5.6mM
- ・ Buffer solution I ; 0.12M NaCl, 0.2% Triton X-100, 1mM EDTA, 50mM HEPES
(pH 7.5)
- ・ Buffer solution II ; 1mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 50mM acetate buffer (pH 5.0)
- ・ 7-diethylamino-3-(4'-maleimidyl-phenyl)-4-methylcoumarin ; 0.4mM in acetonitrile

プロトコール

1. ラット副腎髄質褐色腫細胞 (PC-12) の培養

培養培地は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Chemical Co. Ltd.) に 10% の Horse Serum (Sigma Chemical Co. Ltd.), 5% の FBS, 1% streptomycin (5000I.U./ml)-penicillin (5000 μ g/ml) solution (ICN Biomedicals, Inc.) を添加したものをを用い, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5% のインキュベータ内で培養を行った. 増殖状態を観察しながら, 培地交換及びフラスコ内 80% コンフルエントの状態に継代を行った.

2. 神経細胞分化確認実験

- 1) 細胞を 1×10^5 cells/ml で 10ml ずつディッシュに播く.
- 2) 37 $^{\circ}$ C, 5% の CO₂ で培養する.
- 3) 次の日に NGF を加える (NGF の最終濃度が 50ng/ml になるように).
- 4) サンプルを添加する.
- 5) 24~48 時間, 37 $^{\circ}$ C, 5% の CO₂ で培養する.
- 6) PC-12 細胞突起が伸びているかを顕微鏡で確認する (図 2).
- 7) PC-12 細胞突起の写真撮る.

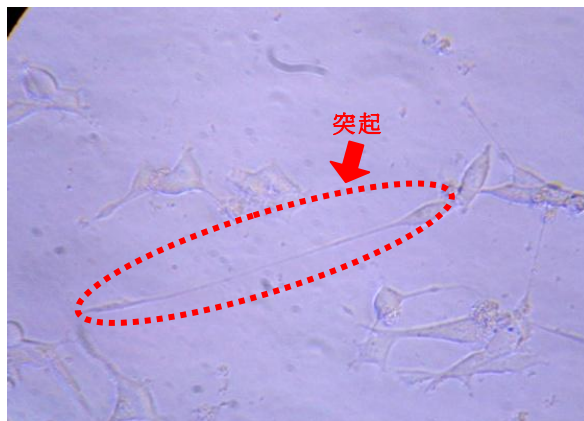


図 2 PC-12 細胞突起の写真

3. AchE 活性測定実験

- 1) 5×10^3 cells/well の PC-12 細胞を 96well プレートに播く.
- 2) 24 時間, 37 $^{\circ}$ C, 5% の CO₂ で培養する.
- 3) サンプルを加え, 48 時間, 37 $^{\circ}$ C, 5% の CO₂ で培養する.
- 4) NGF を加える. (NGF の最終濃度が 50ng/ml になるように)
* サンプルによっては, 4) は省略可能.
- 5) 37 $^{\circ}$ C, 5% の CO₂ で 24 時間培養する.

- 6) 200 μ l の PBS で 2 回洗浄する.
- 7) 5.6mM Acetylthiocholine iodide を 20 μ l, Buffer sol. I (0.12M NaCl, 0.2% Triton X-100, 1mM EDTA, 50mM HEPES ; pH7.5) を 180 μ l 加える.
- 8) 室温で 2 時間放置する.
- 9) 20 μ l の細胞 lysate を新しい 96well プレートに移し, Buffer sol. II (1mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 50mM acetate buffer ; pH5.0) を 160 μ l, 0.4mM の 7-diethylamino-3(4'-maleimidyl-phenyl)-4-methylcoumarin (in acetonitrile) を 20 μ l 加え, 1 時間放置する.
- 10) Fluorescence plate reader (Fluoroskan Ascent FL) により, EX:365nm, Em:450nm の蛍光度を測定した.

計算方法

測定にて得られた結果は, 各 NGF 濃度に対応する NGF 濃度のコントロール値に対する相対活性値として算出した(図 3).

$$\text{相対活性値} = \frac{(\text{試料と各濃度の NGF を添加した細胞の蛍光度})}{(\text{各濃度の NGF を添加した細胞の蛍光度})}$$

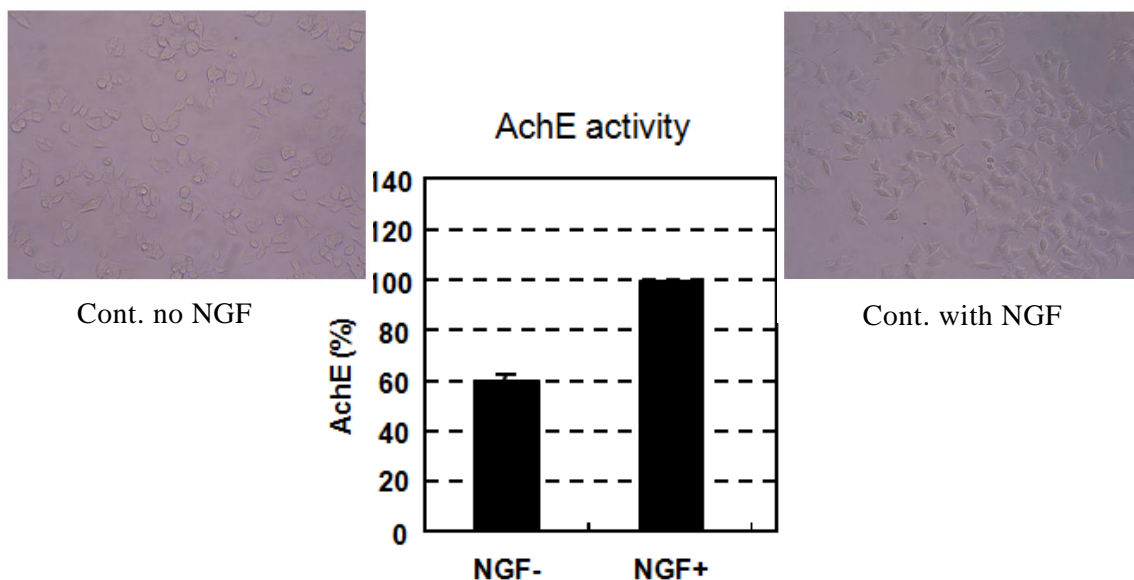


図 3 NGF 処理後の AchE の活性度測定結果

参考文献

- 1) Rieger, F., Shelanski, M.L. and Greene, L.A., The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: increased total specific activity and appearance of the 16 S molecular form. *Dev.Biol.*, **76**, 238-243 (1980).
- 2) Roth, A., Schaffner, W. and Hertel, C., Phytoestrogen kaempferol (3,4',5,7-tetra hydroxyflavone) protects PC12 and T47D cells from beta-amyloid-induced toxicity. *J. Neurosci. Res.*, **57**, 399-404 (1999).
- 3) Hock, C., Heese, K., Muller-Spahn, F., Hulette, C., Rosenberg, C. and Otten, U., Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **241**, 151-154 (1998).
- 4) Marinelli, L., Cammarata, S., Nobbio, L., Schenone, A., Zaccheo, D., Angelini, G. and Tabaton, M., Tyrosine kinase A-nerve growth factor receptor is antigenically present in dystrophic neurites from a variety of conditions but not in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **273**, 67-71 (1999).
- 5) Hellweg, R., Gericke, C.A., Jendroska, K., Hartung, H.D. and Cervos-Navarro, J., NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **16**, 787-794 (1998).
- 6) Huang, CM., Shui, H.A., Wu, Y.T., Chu, P.W., Lin, K.G., Kao, L.S. and Chen, S.T., Proteomic analysis of proteins in PC12 cells before and after treatment with nerve growth factor: increased levels of a 43-kDa chromogranin B-derived fragment during neuronal differentiation. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, **92**, 181-192 (2001).
- 7) Vandenplas, M.L., Mamidipudi, V., Lamar Seibenhener, M. and Wooten, M.W., Nerve growth factor activates kinases that phosphorylate atypical protein kinase C. *Cell. Signal*, **14**, 359-363 (2002).
- 8) Greene, L.A. and Shooter, E.M., The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Annu. Rev. Neurosci.*, **3**, 353-402 (1980).
- 9) 日経バイオ最新用語辞典, 第5版 (日経 BP 社, 東京) pp. 38, 415, 739 (2002).
- 10) 畠中寛, 神経成長因子ものがたり, (羊土社, 東京) pp. 66 (1994).