

第19回神経組織培養研究会

日時：2003年9月6日(土)午後1時? 午後6時

場所：東京医科歯科大学・医科新棟B1階・臨床講堂(1)

会費：1,000円(学生無料)

A. ミニ・シンポジウム「Tissue culture update」

1. 神経幹細胞の培養

望月秀樹(順天堂大学医学部脳神経内科)

2. 海馬切片培養で新生ニューロンを観察する試み

石龍 徳・難波隆志(順天堂大学医学部解剖学・早稲田大学大学院生命理工)

3. 中脳ドパミン神経初代培養と応用

竹島多賀夫(鳥取大学医学部脳神経内科)

4. 成熟動物脊髄後根神経節細胞(DRG neuron)の分散培養法とその応用

三五一憲(東京都神経科学総合研究所発生形態研究部門)

B. Exhibition: ナルジェ・ヌク・インターナショナル(株)

C. ミニ・シンポジウム(続き)

5. 神経系バリアーを構成する血管内皮細胞の培養

神田 隆(東京医科歯科大学医学部神経内科)

6. シュワン細胞の培養

渡部和彦(東京都神経科学総合研究所分子神経病理研究部門)

D. Talk

1. Assembly state-dependent actions of amyloid beta-protein on neuronal cells in culture

道川 誠(国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部)

代表世話人：堀江秀典(早稲田大学先端バイオ研究所)

当番世話人：水澤英洋(東京医科歯科大学医学部神経内科)

当番世話人：道川 誠(国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部)

事務局連絡先：渡部和彦(東京都神経科学総合研究所分子神経病理)

〒183-8526 府中市武蔵台 2-6

TEL: 042-325-3881 ext.4717, FAX: 042-321-8678

E-mail: kazwtb@tmin.ac.jp

神経組織培養研究会ホームページ

<http://neuroi.med.tottori-u.ac.jp/jantc/>

第19回神経組織培養研究会

神経幹細胞の培養

望月秀樹(順天堂大学医学部脳神経内科)

神経幹細胞培養法は, Reynoldsと Weiss により分離培養に成功した. 我々は, この細胞に遺伝子を改変レトロウイルスベクターにより導入し, その後の cell fate につき検討した.

胎生13~15日のマウスおよびラットより線状体を摘出後, F12 / DMEM中で細切する. 遠心後下記の培地にresuspend する.

培養液は F12/DMEM (Hepes Buffer (15mM), glucose (0.6%), sodium bicarbonate (3mM), and glutamine (2.5mM) を含む)を利用した. さらに insulin (25mg/ml), transferrin (100mg/ml), progesterone (20nM), putrescine (60mM), and sodium selenite (30nM) を加えた. 培養の際に EGF(Pepro Tech EC, 20ng/ml)と bFGF(Pepro Tech EC, 20ng/ml)を加えた.

ピペティングをパスツールピペットにて10回施行する. 細胞数を 2.0×10^6 / mlにて25 cm²のculture bottleに培養する. 培地交換は2-3日に一回行う.

培養後6~8日にて神経幹細胞のsphereを500rpm,4minの遠心にて採取する.

約 6×10^5 個の標的細胞を12wellのculture dishに播き、ウイルス上清と共にプロタミン非存在下にて500rpm,2hrで遠心した. 2日後、標的細胞はmediumと共に25 cm²のculture bottleに播き培養した.

海馬切片培養で新生ニューロンを観察する試み

石龍徳・難波隆志 (順天堂大学医学部解剖学・早稲田大学大学院生命理工)

海馬歯状回の顆粒細胞の大部分は生後に新生される。このニューロン新生は成体になっても続いている。我々は、生後に起こるニューロン新生を解析するために、海馬切片培養法を用いている。生後初期(生後1週間目ぐらい)では、細胞の増殖は顆粒細胞下帯 subgranular zone (SGZ) と歯状回門で起こり、それらの新生細胞が移動して顆粒細胞となる。成体になると細胞増殖は SGZ だけで行われるようになる。このように、生後初期と成体で行われるニューロン新生には若干の違いがあるが、似た様式でニューロン新生が起こる。したがって、培養でよく用いられる生後 5-8 日目の海馬切片でニューロン新生を観察した場合は、生後初期のニューロン新生に関する知見が得られるだけでなく、成体海馬で起こるニューロン新生に関する情報も得られる可能性がある。

培養方法は次の通りである。生後 5 日目の海馬を切り出し、McILWAIN Tissue Chopper で 350 μ m の海馬切片を作製する。6穴のプレートに 1ml の培養液(50% MEM / 25%HBSS / 25% horse serum)を加え、そこにテフロン性透明多孔膜 (Millicell-CM)を入れる。その膜上に海馬切片を置き、34 (95% air / 5%CO₂)で培養する。

一般に海馬培養切片は、一週間ほどで安定な状態になると考えられているので、最初の実験では、海馬切片を一週間培養してから BrdU を加え、さらに一週間培養し、BrdU を取り込んだ細胞がどのような種類の細胞になるのかを調べた。その結果、BrdU 陽性細胞が多数観察されたが、BrdU 陽性新生細胞の多くはニューロンにならず、S100 陽性のアストロサイト様細胞に分化していた。In vivo では、BrdU 陽性新生細胞の多くがニューロンに分化するので、この実験系はニューロン新生の観察には適しないと考えられる。次に、培養 30 分前に BrdU をラットに注射し、海馬を切片培養して調べたところ、顆粒細胞層に位置する BrdU 陽性新生細胞の多くがニューロンに分化していた。また、培養直後に 30 分間 BrdU を培養液に加えた場合でも、同じようにニューロンへの分化が見られた。したがって、培養直後の培養海馬切片では、ニューロン新生が in vivo とあまり変わらずに起こるが、培養後1週間経った海馬切片では、ニューロン新生能が低下すると考えられる。これらのことから、海馬切片培養は、培養直後に新生した細胞の発達を観察するには良い系であることが明らかになった。現在、このような実験結果をもとに 2 つの実験を行っている: 1) 生後の歯状回顆粒細胞の発達を、in vivo で観察し、in vitro の実験の基礎データとする 2) 培養前あるいは培養直後に、EGFP 遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させ、ラベルされた細胞の発達を観察する。将来的にはリアルタイムでニューロン新生を観察したい。

ミニ・シンポジウム「Tissue culture update」

3. 中脳ドパミン神経初代培養と応用 鳥取大学医学部脳神経内科 竹島多賀夫

1. E14 ラット中脳を用いた高 TH 陽性細胞率培養法
中脳神経核の同定と切りだし法
microisland (MI) 法
2. アッセイ系としてのMDN-MI 法の応用
MPP+毒性モデル
ケトン体 D-s -hydroxybutyrate, DBHB) の MPP+毒性保護
中脳 MPP 誘発性アポトーシスとGAPDH
パ - キンソン病患者髄液の中脳神経細胞毒性
3. ドパミン神経増殖培養 (ドパミン神経幹細胞培養)

References

1. Peaire AE, Takeshima T, Johnston JM, Isoe K, Nakashima K, Commissiong JW (2003) Production of dopaminergic neurons for cell therapy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 124: 61-74.
2. Fukuhara Y, Takeshima T, Kashiwaya Y, Shimoda K, Ishitani R, Nakashima K (2001) GAPDH knockdown rescues mesencephalic dopaminergic neurons from MPP+ - induced apoptosis. *Neuroreport* 12: 2049-2052.
3. Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL (2000) D-b-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5440-5444.
4. Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, Kawazoe Y, Takeshima T, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y, Kim SU (2000) Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 60: 511-519.
5. Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K (2000) Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology* 55: 437-440.
6. Commissiong JW, Takeshima T, Johnston JM, Shimoda K (1997) Effects of transforming growth factors on dopaminergic neurons in culture. *Neurochemistry International* 30: 393-399.
7. Mishima K, Takeshima T, Nakashima K (1997) A < 10 kilodalton fraction of cerebrospinal fluid from patients with parkinson's disease decreases the survival of rat mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Yonago Acta Medica* 40: 53-61.
8. Takeshima T, Shimoda K, Johnston JM, Commissiong JW (1996) Standardized methods to bioassay neurotrophic factors for dopaminergic neurons. *J Neurosci Meth* 67: 27-41.
9. Takeshima T, Shimoda K, Sauve Y, Commissiong JW (1994) Astrocyte-dependent and -independent phases of the development and survival of rat embryonic day 14 mesencephalic, dopaminergic neurons in culture. *Neuroscience* 60: 809-823.
10. Takeshima T, Johnston JM, Commissiong JW (1994) Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitors increase the survival of rat mesencephalic, dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation. *Neurosci Lett* 166: 178-182.
11. Takeshima T, Johnston JM, Commissiong JW (1994) Mesencephalic type 1 astrocytes rescue dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation. *J Neurosci* 14: 4769-4779.

成熟動物脊髄後根神経節細胞 (DRG neuron) の分散培養法とその応用

東京都神経科学総合研究所・発生形態研究部門

三五一憲

kazsango@tmin.ac.jp

神経細胞・組織の初代培養法を用いた研究は、胎生及び新生動物を対象とした発生、分化に関するものが主流であり、成熟動物を対象としたものは少ない。末梢感覚神経細胞である脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion (DRG)) ニューロンの分散培養は、成熟動物においても容易であり、神経の可塑性、老化や疾患に伴う神経機能障害等を評価する上で有用な実験系である。我々はこの培養系をストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病マウスや G_{M2} ガングリオシド蓄積症モデルマウスに適用して、代謝異常に伴う神経細胞の接着、生存、神経突起伸長等の変化について検討している。また、成熟ラット DRG 培養系を駆使して、神経再生を促進もしくは制御する因子 (特に酸化型ガレクチン-1 やコンドロイチン硫酸プロテオグリカン) の作用機構を解析している。

今回は、我々の研究室で用いている DRG neuron の培養方法について、試薬、器具等を含めて詳しく紹介するとともに、最近の研究成果・経過の一部を報告する。

成熟マウス DRG neuron の分散培養 (概略)

1. 生後 8-9 週のマウスをエーテルで屠殺後、背側の皮膚を切除し、脊椎 (胸部～腰部) を一塊として切り出す。
2. 吻側から尾側に向けてはさみを入れ、脊柱管を切り開いた後、脊髄を除去する。
3. 実体顕微鏡下に DRG を確認し、ピンセット (Inox No.5) で摘出して、Ham's F12 培養液 (Invitrogen) を満たしたディッシュ (Falcon, 3001) に入れる。
4. 摘出した DRG (15-20 個) を実体顕微鏡で観察しながら、神経節に近い部位で線維束を切断して除く。(この処理により、神経細胞の回収率がより高くなる。)
5. 0.2% コラゲナーゼ (Worthington Biochem., Class 3 : 37、90 分) 及び 0.25% トリプシン (Sigma : 37、15 分) による酵素処理の後、トリプシンインヒビター (Sigma: 5drops \approx 150 μ l) を加え、先を細くしたパストゥールピペットを用いて十分にピペッティングする。
6. 30% パーコール (Pharmacia Biotech.) による密度勾配遠心分離 (1,000 回転、5 分) により、ミエリンや非神経細胞を除く。回収した神経細胞を 10% 仔牛血清入りの F12 培養液で 2 回洗って、ポリリジン (Sigma) コートしたディッシュに撒布する。
7. 細胞を撒布したディッシュを CO₂ インキュベーターに入れ、6～12 時間静置した後、無血清培養液 (F12/B27 (Invitrogen)) をディッシュに加える。培養液は 2～3 日毎に交換する。

[参考文献]

- 1) Scott, B.S. Adult mouse dorsal root ganglia neurons in cell culture. *J. Neurobiol.*, 8:417-427. (1977)
- 2) Goldenberg, S.S.S., De Boni, U. Pure population of viable neurons from rabbit dorsal root ganglia, using gradients of Percoll. *J. Neurobiol.*, 14, 195-206. (1983)
- 3) Fukuda, J. Nerve cells of adult and aged mice grown in a monolayer culture: age-associated changes in morphological and physiological properties of dorsal root ganglion cells in vitro. *Dev. Neurosci.*, 7:374-394. (1985)
- 4) Lindsay, R.M. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J. Neurosci.*, 8:2394-2405. (1988)
- 5) 金承業、朝長正徳: 神経組織培養法、藤田企画出版 (1989)
- 6) Horie, H., Ikuta, S., Takenaka, T., Membrane elasticity of mouse dorsal root ganglion neurons decreases with aging. *FEBS Lett.*, 269:23-25. (1990)
- 7) Sango, K., Horie, H., Sotelo, J.R. and Takenaka, T. A high glucose environment improves survival of diabetic neurons in culture. *Neurosci. Lett.*, 129:277-180. (1991)
- 8) Sango, K., Horie, H., Inoue, S., Takamura, Y. and Takenaka, T. Age-related changes of DRG neuronal attachment to extracellular matrix proteins in vitro. *NeuroReport*, 4:663-666. (1993)
- 9) Sango, K., Verdes, J.M., Hikawa, N., Horie, H., Tanaka, S., Inoue, S., Sotelo, J.R. and Takenaka, T. Nerve growth factor (NGF) restores depletions of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro. *J. Neurol. Sci.*, 129:1-5. (1994)
- 10) Horie, H. and Akahori, Y. Three-dimensional cell aggregation enhances growth-promoting activity of NGF in adult DRG. *NeuroReport*, 6:37-40. (1994)
- 11) Hikawa, N., Kiuchi, Y., Maruyama, T. and Takenaka, T. Delayed neurite regeneration and its improvement by nerve growth factor (NGF) in dorsal root ganglia from MRL-lpr/lpr mice in vitro. *J. Neurol. Sci.*, 149:13-17. (1997)
- 12) Davies, S.J., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G. and Silver, J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, 390: 680-683. (1997)
- 13) Haynes, L.W. (ed.), *The Neuron in Tissue Culture*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (1999)
- 14) Sango, K., Yamanaka, S., Ajiki, K., Tokashiki, A. and Watabe, K. Lysosomal storage results in impaired survival but normal neurite outgrowth in dorsal root ganglion neurons from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 28:23-34. (2002)
- 15) Saito, H., Sango, K., Horie, H., Takeshita, K., Ikeda, H., Ishigatsubo, Y. and Ishikawa, Y. Trachea enhances neurite regeneration from adult rat nodose ganglia *in vitro*. *Life Sci.*, 70:1935-1946. (2002)
- 16) Sango, K., Oohira, A., Ajiki, K., Tokashiki, A, Horie, M. and Kawano, H. Phosphacan and neurocan are repulsive substrata for adhesion and neurite extension of adult rat dorsal root ganglion neurons *in vitro*, *Exp. Neurol.*, 182:1-11. (2003)

5. 神経系バリアーを構成する血管内皮細胞の培養

東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学（神経内科） 神田 隆

微小循環系は循環器系の最終目的である物質交換のなされる場である。血液成分から組織に必要な物質を円滑に移行させ、かつ組織から出る老廃物を効率よく回収するため、多くの臓器における微小血管系の血管内皮細胞は有窓であるが、体内の限られた部位においては微小循環系構成内皮細胞は隣接する細胞間でtight junctionを構成し、物質の自由な往来を制限している。これをblood-tissue barrierといい、blood-testis barrier, blood-retinal barrierなど多数のbarrier systemが存在する。なかでも神経系におけるbarrier systemは、神経系の内部環境を維持する上で極めて重要であり、中枢神経系の血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)、末梢神経系の血液神経関門(blood-nerve barrier; BNB)がそれにあたる。近年、脳毛細血管由来の内皮細胞の培養手技が複数のラボで確立し、BBBの分子細胞学的解析が発展したことによってBBB機能の研究は急速に進歩したが、技術的な問題点からどの研究者にも可能な手技と言うには至っていないのが現状である。今回のミニ・シンポジウムでは、BBB/BNBを構成する内皮細胞培養法を主に手技の面から概説し、あわせてわれわれの行っているin vitroの実験系についてお話ししたいと思う。

References

- Takashi Kanda, Toshio Ariga, Masanaga Yamawaki, Robert K. Yu: GM3 regulates protein kinase systems in cultured brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem* 61: 1969-1972, 1993.
- Takashi Kanda, Hiide Yoshino, Toshio Ariga, Masanaga Yamawaki, Robert K. Yu: Glycosphingolipid antigens in cultured endothelial cells of brain microvascular origin; sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 126: 235-246, 1994.
- Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Toshio Ariga, Robert K. Yu: Interleukin-1 β up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7897-7901, 1995.
- Takashi Kanda, Takayuki Iwasaki, Masanaga Yamawaki, Kazuhiko Ikeda: Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. *J Neurosci Res* 49, 769-777, 1997.
- Takashi Kanda, Takayuki Iwasaki, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa, Tadashi Tai: Anti-GM1 antibody facilitates leakage in an in vitro blood-nerve barrier model. *Neurology* 55: 585-587, 2000.
- Takashi Kanda, Masanaga Yamawaki, Hidehiro Mizusawa. Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 60: 301-306, 2003.

シュワン細胞の培養

東京都神経科学総合研究所分子神経病理 渡部和彦

成体マウス後根神経節からのシュワン細胞の培養

1. 成体マウス(我々は4-8週齢を用いている)5匹をエーテル深麻酔により殺す。
2. 背部の皮膚をはがした後、脊柱と脊髄を含む後背部組織を採取し10 cmペトリ皿に移してPBSで洗う。
3. 腹側から脊柱を切り放し、脊髄を露出させ、ピンセットで脊髄を取り除く。頸髄から仙髄にわたり20対余りの後根神経節が顔を出すので、これらをピンセットで1つずつ取り出し、培養液(5%FBS, ペニシリン・ストレプトマイシンを含むDMEM)のはいった6 cmペトリ皿に入れ、付着した血液成分と周囲の結合組織をできるだけ取り除く。
4. 後根神経節を5% FBS, 0.125% collagenase (Worthington Biomedical; CLS-1), 40 unit dispase (Collaborative #40235)を含むDMEMに移し、37°Cで1時間インキュベートする。
5. 反応液を10-15回やさしくピペティングしたのち、ナイロン・メッシュまたはCell strainer (Falcon #2360)に通して細胞を分散させる。
6. 1,000回転5分遠心し、細胞沈殿を培養液5 mlで洗う操作を2回繰り返す。
7. 細胞沈殿を培養液5 mlに浮遊させ、あらかじめ培養液を9 mlずつ入れてある10 cm Poly-L-lysine (mol.wt.>300,000, Sigma #P1524) 塗布ペトリ皿5枚に1mlずつ分注し、37°C, 5%CO₂で培養を開始する。この時点で、浮遊液は大量のミエリン塊を含んでいるので白濁している。一度に大量の培養が必要ない場合は、ミエリン塊を含んだ処理途中の細胞をそのまま凍結保存する(10% dimethylsulfoxide/40% FCS/50%DMEM)。解凍後少なくとも70%程度の生細胞の回収率は期待できる。
8. 2日間静置培養後、浮遊しているミエリン塊を培養液で3回洗浄除去する。残った付着細胞を位相差顕微鏡で見ると、丸い大きな神経節ニューロンがすでに神経突起を伸展させており、小形の細胞はシュワン細胞と線維芽細胞からなっている。シュワン細胞を含む初代混合培養系は以上の通りであるが、シュワン細胞の純培養を得るためには引き続き以下に記すcomplement-mediated cell lysisを行って、混在する線維芽細胞を除去する。
9. ペトリ皿に付着し残っている細胞を10 cmペトリ皿あたり5 mlの0.05%トリプシン-1mM EDTA液で37°C, 10分間保温、0.5 ml FBSを加えてトリプシンを不活化したのち細胞をはがし、1,000回転5分遠心し細胞を集める。細胞を抗マウスThy-1.2抗体(F7D5, Serotec #MCA02; 1,000倍希釈)を含む培養液1 mlに再浮遊させ、30分氷上静置したのち、遠心し細胞を集め上清を捨てる。さらにこの細胞をウサギ補体(Cappel #55866; 10倍希釈)を含むDMEM 1 mlに再浮遊させ、37°C, 45分保温後、遠心し細胞を集め上清を捨てる。細胞を培養液に再浮遊し、新しい10 cm Poly-L-lysine塗布ペトリ皿にまいて培養を継続する。以上の操作を2日おいて2回以上繰り返すことにより、細胞膜にThy1.2抗原を発現している線維芽細胞のほとんどはcell lysisにより姿を消す。また、神経節ニューロンもそのほとんどが上記培養操作により3週間以内に消失し、結果的に95%以上純粋なシュワン細胞の培養系を得ることができる。

参考文献

1. Watabe K, et al. Transfection and stable transformation of adult mouse Schwann cells with SV-40 large T antigen gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990; 49: 455-467.
2. Watabe K, et al. Mitogenic effects of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor- β , and heparin-binding serum factor for adult mouse Schwann cells. *J Neurosci Res* 1994; 39: 525-534.
3. Watabe K, et al. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities. *J Neurosci Res* 1995; 41: 279-290.
4. Watabe K, et al. Establishment and characterization of immortalized Schwann cells from murine model of Niemann-Pick disease type C (spm/spm). *J Peripher Nerv Syst* 2001;6:85-94.
5. Shen J-S, Watabe K, et al. Establishment and characterization of spontaneously immortalized Schwann cells from murine model of globoid cell leukodystrophy (Twitcher). *J Neurosci Res* 2002; 68: 588-594.
6. Watabe K, et al. Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology* 2003; 23:64-74.

A β 1-42 によって誘導される神経毒性に対する A β 1-40 の細胞保護作用の検討
K. Zou¹⁾, D. Kim²⁾, A. Kakio³⁾, K. Byun²⁾, J.-S. Gong¹⁾, M. Kim²⁾, N. Sawamura¹⁾, S. Nishimoto³⁾, K. Matsuzaki⁴⁾, B. Lee²⁾, K. Yanagisawa¹⁾, and M. Michikawa¹⁾

1) 国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部, 2) College of Medicine and Institute of Medical Science, Cheju National University, 3) 京都大学大学院工学研究科 4) 京都大学大学院薬学研究科

はじめに：我々は、A β が重合(凝集)状態に依存した作用を持つことを明らかにし、当学会で発表してきた。すなわち、重合体 A β では神経細胞内コレステロール代謝障害を誘導する (Michikawa et al, J Neurosci, 2001; Gong et al, J Neurosci Res, 2002) が、単体 A β は、金属と結合して活性酸素の発生を抑制し、細胞保護作用を発揮すること(Zou et al, J Neurosci, 2002)を見出した。今回は、単体 A β (重合体 A β 1-40) が重合体 A β 1-42 の神経毒性作用に対する影響を検討した。

対象と方法：神経細胞培養は、E17 のラット大脳皮質から調整した。A β 1-40 および A β 1-42 は、既報の方法(Zou et al, J Neurosci, 2002)により準備し、培養に加えた。A β の凝集状態は、thioflavin-T アッセイおよび電子顕微鏡によって評価した。また、A β 1-42 および A β 1-40 のラット脳内への注入を行い、タウのリン酸化および反応性アストロサイトの出現を定量した。

結果:1) A β 1-42 を 2-3 μ M 以上の濃度で加えると、添加後 2 日目にはほぼ 100% 近く神経細胞死が誘導された。2) 5 μ M 以上の濃度の A β 1-40 は、A β 1-42 による神経細胞死を抑制した。3) しかし、金属キレーターは、A β 1-42 による神経細胞死を抑制できなかった。4) また A β 1-42 (5 μ M) を 37°C、24 時間インキュベーションして形成されるアミロイドも、5 μ M 以上の濃度の A β 1-40 によって抑制された。5) A β 1-42 の大脳皮質内投与により、海馬におけるタウのリン酸化亢進、投与部位での GFAP 陽性細胞数の増加がみられ、A β 1-40 を加えることで、それらは抑制された。

考察：A β 1-40 は A β 1-42 の重合化/アミロイド形成を抑制することで A β 1-42 の神経毒性を抑制すると考えられた。細胞外では A β 1-40/A β 1-42 比が約 10/1 であり、A β 1-40 は A β 1-42 の重合化を抑制するに十分な量が存在するが、家族性アルツハイマー病などではこの比が低下し、重合化/アミロイド形成が促進し、病態プロセスを促進する可能性がある。