

1P-233 カドミウム曝露によるマウス神経幹細胞由来アストロサイトのGFAP局在性の変化

森 英樹, 西川 麻裕, 佐々木 豪, 原 正之
(阪府大院・理・生物学)
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【目的】カドミウム(Cd)は毒性の高い重金属である。現在でも発展途上国を中心に鉱山や工業排水からの汚染による健康被害が報告され、骨形成疾患や神経発生毒性を有するが、その詳細な作用機構は不明である。神経幹細胞/前駆細胞(NSPC)は培養により増殖可能で、かつ中枢神経系の神経細胞(neuron)やグリア細胞に分化できる為、神経発生毒性の評価系として期待されている。本研究は、カドミウム曝露によるマウス NSPC とその分化細胞への影響を評価した。

【方法・結果】胎生14日目のICRマウス脳由来NSPCをEGF, FGFなどを含む無血清培地で培養し、1%(v/v)ウシ胎仔血清(FBS)を含む培地でNSPCを1週間培養して分化誘導した。NSPCに対するCdCl₂の細胞半数致死濃度(IC₅₀)16 μM以下の各濃度におけるNSPCの分化能、分化後のneuronとastrocyteの割合(N/G比)、astrocyteの形態を比較した。神経細胞は抗tubulin β III抗体、astrocyteは抗glial fibrillary acidic protein (GFAP)抗体で免疫組織化学染色と観察を行った。NSPCからの分化誘導時と分化後のN/G比に著しい変化はないが、astrocyte細胞内のGFAPの局在性が変化し、CdCl₂ 2.5-5.0 μMの範囲では濃度依存的にGFAP染色領域が減少した。また、RT-PCR法により調べたメタロチオネイン遺伝子(Mt I, Mt II)の発現はNSPCより分化細胞で高かった。参考文献: Hideki Mori, Masayuki Hara, Cultured stem cells as tools for toxicological assays, J. Biosci. Bioeng., (2013) 印刷中。

Change in localization of GFAP within astrocytes differentiated from the murine neural stem/progenitor cells by exposure to cadmium ion.

Hideki Mori, Mayu Nishikawa, Go Sasaki, Masayuki Hara
(Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words neural stem cell, glial fibrillary acidic protein, cadmium

1P-234 マウス神経幹細胞/前駆細胞の分化による亜鉛感受性の変化

西川 麻裕, 森 英樹, 原 正之
(阪府大院・理・生物学)
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【緒言】亜鉛は生体内で二番目に多く存在する金属元素で、その恒常性はトランスポーターや金属結合性タンパク質の働きにより維持されている。神経幹細胞/前駆細胞(Neural Stem/Progenitor Cells: NSPC)は自己複製能と、中枢神経系を構成する細胞へと分化できる多分化能を併せ持つことから神経発生毒性研究に用いられる。亜鉛の同族元素であるカドミウムや水銀が中枢神経系の機能や発達に影響を与えることは知られているが、その作用機序は未だ明らかでない。本研究では、亜鉛曝露時のNSPCとその分化誘導細胞の生存率、および金属結合性タンパク質であるメタロチオネインの遺伝子発現量の変化を解析した。【方法及び結果】実験には、胎齢14日目のICRマウス大脳皮質から採取したNSPC、およびNSPCを1%ウシ胎仔血清(Fetal Bovine Serum: FBS)を含む培地で1週間分化誘導した細胞を用いた。細胞は96ウェルプレートで培養し、0.001~0.5mMの塩化亜鉛溶液(ZnCl₂)に24時間曝露後、テトラゾリウム塩を用いた改良MTT法(WST-8)で生細胞数を測定した。また、定量的RT-PCR法でメタロチオネインの遺伝子発現量を比較した。NSPCに対する塩化亜鉛のIC₅₀値は分化細胞に対するIC₅₀値より低かった。また、メタロチオネインの遺伝子発現量も分化細胞の方が高かった。

Differential cytotoxic sensitivity in mouse neural stem/progenitor cells and their differentiating cells exposed to zinc ion

Mayu Nishikawa, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words zinc, neural stem/progenitor cell, differentiation, metallothionein

1P-235 細胞骨格リモデリング過程における細胞の力学解析

吉田 拓士¹, 木原 隆典², ハグバラスト セュイドモハマドアリ¹, 三宅 淳¹
(¹阪大院・基礎工, ²北九大院・国際環境工)
takanori.kihara@gmail.com

細胞の内部には大小様々なオルガネラや繊維性構造体が存在する。細胞はその種類によって特徴的な形態を取っており、主にはアクチン繊維・微小管によって制御されている。特にアクチン繊維は、周囲の環境や細胞の状態に応じてダイナミックに構造を変化させることで、細胞の表面構造や形態を変化させる。こうした物理的変動は、生命体である細胞の動力とも言える。細胞の物理的理解・制御機構の解明は生物学の有する古くからの課題である。我々は、こうした細胞の物理的性質を解析する方法として、直接の力学解析を可能にする原子間力顕微鏡(AFM)を用いている。本研究は、AFMを利用し、細胞表面における機械特性のダイナミックな変化の様子を可視化することで、アクチン繊維が細胞表面近傍における物理的構造体としてどのように作用しているか解析を行った。

ヒト正常線維芽細胞TIG-1と、ヒト子宮がんHela細胞の細胞表面の力学構造を観察したところ、TIG-1細胞には機械特性の高い多くの繊維状構造物が観察されたが、Hela細胞では機械特性の低い構造物がまばらに観察されるのみであった。こうした繊維状構造物はY27632によって消失することからアクチン繊維であることがわかる。さらにCalyculinAを用いることで、細胞表面におけるアクチン繊維のダイナミックな動態を観察することに成功した。細胞の機械特性は力学的構造体としてのアクチン繊維に依存しており、アクチン繊維の構造のみならず、構造物自身の機械特性によっても大きく変化する。

Mechanical analysis of cytoskeleton remodeling process

Okutaku yoshida¹, takanori kihara², S.M.A. Haghparast¹, jun miyake¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²Dept. Life Environ. Eng., Univ. Kitakyusyu)

Key words atomic force microscopy, cell mechanics, young's modulus, actin filaments

1P-236 細胞内外における分子拡散解析

伊東 潤一¹, 木原 隆典², 山崎 淳平¹, 三宅 淳¹
(¹阪大院・基礎工, ²北九大院・国際環境工)
takanori.kihara@gmail.com

生命は生体環境という特異な物理化学環境を構築することで、生存環境を維持している。細胞質空間・細胞外マトリックス空間は水に満たされていると同時に、多くの構造体・高分子の存在により不均一な環境が形成されている。生体分子はこうした不均一・高密度な空間内をその物理環境に従って移動しており、様々な生理作用・信号伝達を実現している。特に37度の熟環境下において拡散は重要な分子の輸送体系であり、生体内の物理化学環境の影響を大きく受ける。そこで本研究は、細胞内外における分子拡散の定量解析を行うことで、分子拡散が細胞内外の構造物によってどのように制御されているかについて解析を行った。

拡散解析手法として、蛍光相関分光法を用いた。本法はターゲットとして蛍光分子を利用しなければならないという制約はあるが、細胞内外の特定部位を狙った高解像度の計測が可能であり、実際に生きた細胞内におけるダイナミックな生体分子の動態を解析するのに適した手法である。

まず、蛍光プローブの導入が容易な細胞外環境における分子拡散解析を行った。細胞外環境下における分子拡散制御因子としてコラーゲン線維に着目し、コラーゲンゲル内培養時における分子拡散の計測を行った。その結果、コラーゲンゲル収縮による細胞近傍の分子拡散のダイナミックな変化を捉えた。また、細胞内環境下においては、細胞膜に小孔を開けたセミインタクト細胞を用い、生細胞内とセミインタクト細胞内における蛍光プローブの拡散係数の比較により、核内における分子拡散制御の様子について観察することにも成功した。

Analysis of molecular diffusion in and around cells

Junri Ito¹, Takanori Kihara², Junpei Yamasaki¹, Jun Miyake¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., ²Dept. Life Environ. Eng., Univ. Kitakyusyu)

Key words fluorescence correlation spectroscopy, diffusion coefficient, collagen fibers, permeabilized cell