

W1-03

不死化シュワン細胞株 IFRS1 を用いた髄鞘形成および脱髄の機構解析

三五 一憲, 渡部 和彦

東京都医学総合研究所・神経変性病理プロジェクト

我々は成熟 Fischer ラット末梢神経の初代培養系から、不死化シュワン細胞株 IFRS1 を樹立した。IFRS1 細胞は、S100, GFAP 等のグリア系細胞マーカーや NGF, GDNF, CNTF 等の神経栄養因子を発現し、成熟シュワン細胞としての特性を保持していた。また IFRS1 は、後根神経節 (DRG) ニューロンや PC12 細胞との共培養において髄鞘形成能を有することが明らかとなった。成熟動物由来の細胞同士、あるいは株化細胞同士による共培養系確立・髄鞘形成はこれまで報告がなく、末梢神経の変性・再生機構の解析に有用と考えられる。現在これらの共培養系を用いて、glucagon-like peptide (GLP)-1 受容体作動薬 exendin-4 (Ex-4) による軸索再生・髄鞘形成誘導作用のメカニズムや、抗不整脈薬 amiodarone (AMD) による脱髄性ニューロパチーの病態を解析している。

i) Ex-4: 培養液中に投与された Ex-4 は、濃度依存的 ($1 \text{ nM} < 10 \text{ nM} < 100 \text{ nM}$) に DRG ニューロンの生存・神経突起伸長を促進するとともに、DRG ニューロン-IFRS1 共培養系における髄鞘形成を誘導した。Ex-4 は膵β細胞刺激による生理的なインスリン分泌促進に加え、末梢神経系に直接作用して糖尿病性ニューロパチーを改善する可能性が示唆された。

ii) AMD: 培養液中に投与された AMD は、濃度依存的 ($1 \mu\text{M} < 5 \mu\text{M} < 10 \mu\text{M}$) に IFRS1 細胞内リン脂質の蓄積やオートファジーマーカー LC3-II および p62 の発現を誘導した。また $20 \mu\text{M}$ の AMD 負荷により、PC12-IFRS1 共培養系における IFRS1 細胞の脱落や髄鞘蛋白 P0 の発現低下がみられた。AMD はシュワン細胞内にリン脂質代謝異常やオートファジー不全を惹起し、これらが脱髄の誘因となる可能性が示唆された。

W1-04

免疫電顕から探る機能神経解剖の解析法

坂本 浩隆

岡山大学理学部附属臨海実験所

我々は、「免疫電顕」を用いてホルモン動態解析からエキソサイトーシスの分子機構の解明を目指した機能神経解剖学的研究を展開している。その中で現在、生きたニューロンを用いてバソプレシン (VP) およびオキシトシン (OT) のエキソサイトーシス・分子機構を超微形態レベルで解析する試みを行っている。まず、脳、脊髄、下垂体後葉などの急性スライスに高カリウム刺激を与えることにより、エキソサイトーシスを人為的に誘発した。その後、スライスを速やかに固定し、常法に従い樹脂包埋を行い、包埋後染色として VP/OT に対する免疫染色を施し、電顕観察した。結果、エキソサイトーシス活性を電顕で解析できる手法を確立した。現在、この手法を用いて、中枢神経系におけるシナプス領域以外 (樹状突起や軸索) からの VP/OT の放出活性を超微形態レベルで解析している。

一方、VP/OT 遺伝子と蛍光タンパク質 (GFP/RFP) との融合遺伝子を導入されたトランスジェニック・ラットが作出された。これらの遺伝子改変ラットを用いれば、蛍光シグナルを指標として、VP/OT の分子動態をライブイメージングすることが可能になると考えられる。我々は予備的解析として、これらの遺伝子改変ラットにおいて、GFP/RFP は VP/OT と同様に分泌顆粒内に取り込まれており、エキソサイトーシスにより血中へ放出されることを電顕的に明らかにした。即ち、これらの遺伝子改変ラットは、VP/OT の蛍光ライブイメージングにおいて、優れたモデルであると言える。

今回、免疫電顕を用いた超微形態レベルでの解析から、エキソサイトーシスの分子機構に迫れる可能性を示した。近い将来、これらの超微形態解析と蛍光ライブイメージングとの融合解析の実現により、先端的な機能神経解剖学的アプローチが可能になると期待される。