

D202

低毒性アミロイドを細胞接着場とした新規細胞培養系の開発

(JST さきがけ・理研) ○ (正) 迫野昌文^{*}, (京工繊大) 秋山茂範, (理研) 小林隆宏, (理研) 座古保, (秋田工専) 榊秀次郎, (京工繊大) 和久友則, (理研) 前田瑞夫, (京工繊大) 田中直毅

緒言 アルツハイマー病等に代表される神経変性疾患において、タンパク質やペプチドから形成されるアミロイド凝集体の組織への蓄積が病因となることが知られている。アミロイド凝集体の構造として線維状構造が広く知られている。一般に線維状構造体は、それを形成するモノマー状態と比較して極めて高い細胞毒性を有していることが多い。我々はこれまでに、アミロイド凝集を起こすペプチドとして代表的に知られるインスリンを用いて、毒性の異なる線維状凝集体を作製することに成功している¹。本研究では、これらの線維状凝集体を細胞接着の足場として用いた細胞培養系を開発することを目的とした。低毒性のアミロイド線維を細胞外マトリックスとして模倣することにより、組織再生の基板としての役割が期待され、また神経変性疾患の新たな治療法としての可能性を持つと考えられる。

実験 既報¹にしたがい、高毒性及び低毒性インスリンアミロイド線維を作製した。イオン交換水を用いて、アミロイド線維水溶液が 0–200 µg/mL の濃度になるように希釈し、PS 製の 96 ウェルプレートに 150 µL/well ずつ滴下した。これを 35 °C のインキュベータ内に入れ、24 時間かけて乾燥させることでプレート上にアミロイド線維をコーティングした。このプレートにマウス由来頭蓋冠細胞 (MC3T3-E1 細胞) を含む MEM- α 培地 (10 % FBS, Antibiotic-Antimycotic 含有) を、細胞数が 1×10^4 cells/well になるように添加して 37 °C, 5 % CO₂ の雰囲気下で 8 時間培養した。各種分析法を用いて、プレートへの細胞の接着性及び細胞増殖性を調べた。

結果及び考察 アミロイド線維上に接着している細胞の数を WST-8 assay により定量して、二種類の形状のアミロイド線維上における細胞接着数を比較した (Fig. 1)。100 µg/mL の低毒性アミロイド線維をコーティングしたところ、細胞接着数が非添加に比べて約 8 倍増加した。しかし、高毒性アミロイド線維では非添加に比べて約 2 倍強と接着数が減少した。このことから、アミロイド線維をコーティングすることで細胞接着性が向上し、また低毒性凝集体を用いることでさらに接着性が増すことが明らかになった。次に、接着細胞とプレ

ート上に固定したアミロイド線維の相互作用を調べた。全反射顕微鏡を用いてプレート上に固定したアミロイド線維を観察し、同一ステージ上の細胞の透過像を重ね合わせた (Fig. 2)。どちらのアミロイドにおいても、全反射顕微鏡でアミロイド線維の蛍光像が見られたことからアミロイドはプレート上に固定化されていることが示された。また、細胞が固定化されたアミロイドに重なる形で接着していることが透過像より示された。さらに、接着した細胞は伸展していることから、極めて良好に細胞の接着が実現できていることが示唆された。

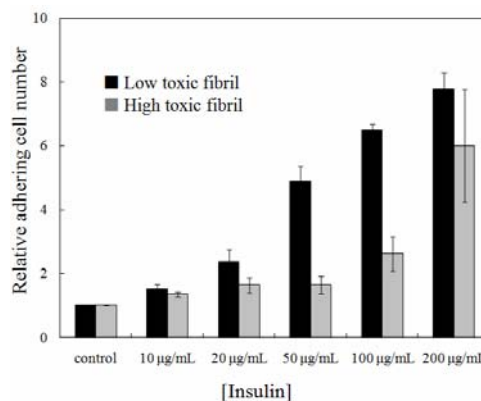


Figure 1 添加したインスリン凝集体量に対する接着した細胞の割合 (control は非添加)

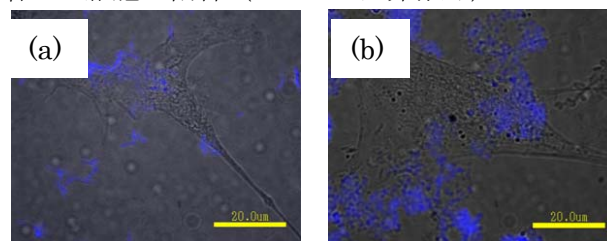


Figure 2 アミロイド線維 (青) 上における細胞の接着伸展 ((a)高毒性(b)低毒性アミロイド)

結言 低毒性アミロイド線維コートプレートは優れた細胞接着性を示し、またアミロイド上における細胞の伸展も観測された。よって、このプレートは細胞の機能性足場材料として有用であることがわかった。

参考文献 1. Zako T., Sakono M. *et al.*, Biophys J. (2009) **96**, 3331

*E-mail msakono@riken.jp