

神経細胞の軸索成長における細胞外脂質メディエーターの役割

福島 伸之 [北海道大学大学院医学研究科/助手]

背景・目的

神経細胞はその細胞体から軸索を伸ばして他の細胞とシナプスを形成する。軸索の成長は、神経突起発芽およびその部位決定、軸索への運命付けおよび最終目的地への伸展、から成立するが、その制御機構はいまだ不明な点が多い。我々は細胞外脂質メディエーターであるリゾフォスファチジン酸(LPA)が伸展中の神経突起およびその先端にある成長円錐の形態的な成長を抑制することを報告し、LPAの軸索成長に対する生理的役割を示唆してきた。本研究ではより生理的条件下と考えられるLPAの濃度勾配条件を培養下にて作成し、LPAの軸索成長、特に軸索形成部位決定における役割を検討した。

内容・方法

[内容] これまで行われてきた培養神経細胞を用いた多くの実験では培養液中にLPAが添加されており、細胞全体にLPAが曝露された状態で細胞反応を観察していることになる。本研究ではLPAの濃度勾配が形成される培養系を単離培養海馬神経細胞を用いて作成し、LPAが軸索形成箇所決定にどのように影響するかについて調べた。

[方法] LPAおよびそのキャリア蛋白質として牛血清アルブミン(脂肪酸フリー体)を混和したアガロースゲル小片を培養皿の端に接着させ、その近傍(約1mmの距離)で海馬細胞を静置培養した。これにより培養液中においてLPAの濃度勾配が形成されると考えられる。培養4日目に細胞を固定し、抗ニューロフィラメント抗体により軸索を染色した。アガロースゲルに対する軸索形成箇所(根幹部)の相対的位置を近位側(アガロース側)および遠位側(反対側)に分けて数値化した。

結果・成果

海馬細胞を胎仔から単離して培養した時、培養開始時点では円形状であった細胞はその後24時間以内に数本の突起を形成しはじめた。培養1日目では約65%の細胞が突起を伸展させ、培養日数とともに突起を有する細胞の割合が増加した。培養2、4日目ではこれらの突起のうち1本が明らかに他の突起よりも比較的長かった。軸索マーカーとして用いられているリン酸化ニューロフィラメントに対する抗体を用いて染色したところ、培養1日目ですでにリン酸化ニューロフィラメント陽性の突起を1本だけ有した細胞が観察され、この時点で軸索としての運命

決定が行われていることが考えられた。培養2、4日目にはほとんどの細胞において1本の長い軸索が確認された。

細胞体における軸索根幹部を顕微鏡下において明らかにし、アガロースゲルに対する相対的位置を検討した。LPAを含まないコントロールのアガロースゲルを置いた場合、培養1日目では近位側にある軸索根幹部を有する細胞は全体の細胞の32.8%であり、遠位側に根幹部を持つものは33.3%であった。これは通常の培養条件下では軸索がランダムに形成されていることを示唆している。これに対しLPAを25 μ M含有するアガロースを存在させると、近位側に根幹部を持つ細胞の割合はコントロールに比べて減少した(30.1%)。逆に遠位側から軸索が伸展している細胞の割合は増加を示した(39.8%)。250 μ MのLPAを使用した場合も同様の傾向が観察された。このLPAの軸索形成に対する抑制的効果は培養2および4日目においても認められた(培養2日目:近位側:50.3%[コントロール]vs39.8%[250 μ MLPA],遠位側:49.7%[コントロール]vs60.2%[250 μ MLPA],培養4日目:近位側:49.7%[コントロール]vs41.4%[250 μ MLPA],遠位側:50.3%[コントロール]vs58.6%[250 μ MLPA])。しかしながらこのようなLPAの効果はいずれの培養日数においてもわずか1割程度の細胞においてみられただけであった。このことはいくつかの理由によって説明されるかもしれない。1つ目はLPAの効果が持続しない可能性である。LPAはキャリア蛋白であるBSAと共存しているがアガロースからの浸出が比較的早いいため濃度勾配の形成が短時間で終了してしまうことが考えらる、2つ目はLPA以外にも重要な細胞外因子が存在しているかもしれない。3つ目はLPA反応性細胞の割合が少ない。

このような考慮されるべき可能性に関わらず、今回の結果は初めてLPAが軸索形成部位の決定に関わっていることを示唆したものである。神経細胞にとって正常な細胞極性の形成は成長にともなう正常な形態発育と機能の発揮に必須であるが、これまで細胞外因子の極性形成における役割を示した報告はわずかしかない。LPAがそのような細胞極性調節分子として機能していることを示した本研究は神経ネットワーク形成や脳の形態形成の研究に重要な示唆を与えるものと思われる。

今後の展望

本研究では初めてLPAが神経細胞の極性に影響することを示した。しかしながら上述したようにLPAの持続的かつ安定的な濃度勾配の形成が実験の本質に必要なとされる。これには現在用いている基剤(アガロース)、培養皿の材質、接着法などを根本的に変えることで達成できることであるが、新たなチャレンジと考え研究を進めていくことが重要と思われる。