

|              |                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 酸化的ストレスの神経細胞分化に与える影響                                                            |
| Author(s)    | 小川, 晃司                                                                          |
| Citation     |                                                                                 |
| Issue Date   | 2004-03                                                                         |
| Type         | Thesis or Dissertation                                                          |
| Text version | none                                                                            |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/10119/3113">http://hdl.handle.net/10119/3113</a> |
| Rights       |                                                                                 |
| Description  | Supervisor:高木 昌宏, 材料科学研究科, 修士                                                   |

## 酸化的ストレスの神経細胞分化に与える影響の解析

小川 晃司（高木研究室）

【背景と目的】恒常的な外部ストレスが量的、質的に変化して、細胞応答に異常が生じた時、細胞は機能障害を起こして組織や臓器に疾患を引き起こす。紫外線などの外部ストレスは細胞内に活性酸素種を発生させて酸化的ストレスを引き起こす。活性酸素種は細胞増殖や生存、アポトーシスなどの多くの生理現象において重要な役割を果たしているが、細胞内に発生した活性酸素種を十分に消去しきれなかった場合、酸化的ストレスが生じ、細胞に傷害を与える。

我々は、白血病性 T 細胞 Jurkat をカドミウム (Cd) 処理した場合、NO が関与する酸化的ストレスを与えることを明らかにしてきた。細胞死よりも鋭敏に影響を受けると考えられる神経細胞分化に対して、Cd による酸化的ストレスの影響を、マウス胚性腫瘍細胞株 P19 を用いて解析し、10  $\mu$ M、6 時間の Cd 処理によって軸索を観察することができた。そこで、本研究では細胞内で活性酸素種を発生させる働きを持つメチルピオロゲン (MV) を用いて、酸化的ストレスと神経細胞分化の関係を明らかにすることを目的とした。

【実験】P19 細胞は多能性細胞であり、発生や分化のモデル系として広く用いられ、レチノイン酸 (RA) 処理によって神経に分化する。まず、MV 濃度に対する P19 細胞の生存率を細胞増殖試験により測定し、生存率曲線を作成した。次に、MV の分化に対する影響を調べるため、生存増殖試験の結果から MV 濃度の範囲と処理時間を決め P19 細胞を培養した。さらに細胞外の刺激を細胞核へ伝える重要なシグナル伝達経路である MAP キナーゼ (JNK、p38) の活性化状態をウエスタンブロッティングにより観察した。神経細胞に特異的なタンパク質であるニューロフィラメント (NF) の発現を、免疫蛍光染色法を用いて検出した。また、抗酸化作用を持ち活性酸素種を消去する還元型グルタチオン (GSH) を用いて、P19 細胞を培養した。

【結果と考察】MV 刺激強度に応じて、増殖、アポトーシス、ネクローシスと細胞応答が変化した。さらに増殖を示した 1  $\mu$ M の MV で 6 時間処理し、無血清培地に移して 2 日間培養したところ、光学顕微鏡により軸索様のフィラメントを観察することができた。また、MV 処理時と RA 誘導時における JNK や p38 のリン酸化状態の変化を経時的に比較、検討した結果、RA 誘導時と同様に短時間で p38 が活性化し、JNK は活性化していなかった。そして、この軸索様のフィラメントを持つ細胞から NF を検出でき、神経細胞に分化していることが分かった。

P19 細胞の神経細胞への分化誘導は軽度の酸化的ストレスによって引き起こされると考え、1 mM の GSH と 1  $\mu$ M の MV の両方で細胞を処理し、MV による活性酸素種を消去した。まず、GSH のみで処理して GSH の分化への影響を調べ、次に GSH と MV を混合して処理した。その結果、GSH のみの時と混合した時の両方で軸索を観察できた。したがって、酸化的ストレスに対しての細胞応答による還元的な状態が、神経細胞への分化を誘導していると考えた。



Fig. 1. MV 処理後、無血清培地中での P19 細胞



Fig. 2. GSH 処理後、無血清培地中での P19 細胞

キーワード：酸化的ストレス、神経細胞、分化