

## ニワトリ色素上皮細胞の単離培養条件下における電位依存性イオンチャネルの発現と発達

千葉 泰博 (筑波大学 生物学類 4年)

指導教官：斎藤 建彦 (筑波大学 生物科学系)

### (導入・目的)

一般に中枢神経系は再生不可能と言われている。しかし、多くの脊椎動物では、その胚発生の初期において神経性網膜に損傷を受けると、周囲の細胞が増殖して失われた神経回路を修復・再生することができる。Park & Hollenberg (1991) は、ニワトリ初期胚の眼球から網膜を完全に除去した後、塩基性繊維芽細胞成長因子 (FGF2) を染み込ませたペレットを眼球内に挿入すると、網膜色素上皮 (RPE) 細胞層から網膜が再構築されることを報告している。また、当研究室の先行研究により、ニワトリ初期胚の眼球から取り出した RPE 細胞層を FGF2 存在下において浮遊培養すると、形態学および生理学的に発生網膜と相同の組織を形成することが明らかとなっている。そこで、単離培養条件下においても、RPE 細胞から神経細胞への形態学的・生理学的な分化転換現象は見られるかという点に注目して本研究を進めた。今回、神経細胞への分化転換は、電位依存性の  $\text{Na}^+$  チャネルや  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの発現をもって指標とした。

### (方法)

#### 1) RPE 細胞の単離培養

ニワトリ初期胚 (孵卵 4.5 日) から眼球を摘出し、RPE 細胞単層とした。取り出した RPE 細胞を 0.25% トリプシン溶液で 37.0°C・15 分間処理し、ピペッティングによって個々の細胞にばらした。コラーゲンコートをしたカバーガラス上に細胞をまき、30 分間静置・接着させた。培養液中に FGF 2 を 10 ng/ml の濃度で加え、37.0°C・5%  $\text{CO}_2$  濃度において培養した。培養液の交換は 3 日に 1 回、全量を交換するものとした。

#### 2) パッチクランプ法による電位依存性イオンチャネルの解析

RPE 細胞を接着させたカバーガラスを記録用チャンバーに置き、ワセリンによって固定した後、ホールセル・パッチクランプ法を用いて細胞の電気的膜特性の解析を行った。このとき、必要に応じて EDTA 処理を施し (5~15 分間) 細胞をばらして記録を行いやすくした。はじめに細胞膜を -70 mV に電位固定し、-90 mV から +50 mV までの 10 mV ステップの電位固定を行った際の電流応答を記録した。なお、電極抵抗は 8 M $\Omega$  程度とした。電位依存性の  $\text{Na}^+$  電流や  $\text{Ca}^{2+}$  電流を顕在化するため、電位依存性  $\text{K}^+$  チャネルの活性化による外向き電流は Tetraethyl ammonium chloride (TEA) および 4-Amino pyridine (4-AP) で阻害した。また、電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルの阻害剤として Tetrodotoxin (TTX)

を、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの阻害剤として Nicardipine を含んだ細胞外溶液をそれぞれ灌流することにより、電流の解析を行った。

### (結果・考察)

FGF2 存在下で RPE 細胞を培養すると、細胞は培養 2 日目頃から分裂・増殖を繰り返してしだいに色素を失い、細胞体から細長い突起を伸長させるといった形態学的な変化を見せた。これらの細胞からは電位依存性の一過性内向き電流が観測された。この電流は、外液の  $\text{Na}^+$  イオンを零にするか、TTX を含んだ細胞外溶液を灌流することによって消失したため、電位依存性  $\text{Na}^+$  電流であることが明らかになった。この電位依存性  $\text{Na}^+$  電流の発現率は培養 1 週間前後まで徐々に増加し、その後減少傾向が見られた。また、培養経過に伴って  $\text{Na}^+$  電流量の増加が認められた。

一方、この培養細胞からは電位依存性の持続性内向き電流も観測された。この電流は、Na-free 溶液および TTX によって消失することはなかったが、Nicardipine を含んだ細胞外溶液を灌流することにより消失した。このことから、この持続性内向き電流は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流であることが明らかになった。これら両電流成分の発現率と最大  $\text{Na}^+$  電流量平均を以下に示す。

培養日数	1-3DIV	6-9DIV	12-15DIV
$\text{Na}^+$ 電流発現率	39.0%	56.8%	28.3%
最大 $\text{Na}^+$ 電流量	-116.6pA	-162.8pA	-245.5pA
$\text{Ca}^{2+}$ 電流発現率	34.2%	40.9%	28.3%
最大 $\text{Ca}^{2+}$ 電流量	-64.6pA	-104.63pA	-158.0pA

以上のことから、ニワトリ RPE 細胞は単離培養条件下においても、形態学および機能的に神経細胞様の性質を発現することが明らかになった。これらと同様の結果は、ヒト (Wen et al., 1994) やラット (Botchkin and Matthews, 1994) およびイモリ (Sakai and Saito, 1994) の RPE 細胞においても確かめられている。RPE 細胞を神経化へと向かわせる因子は何なのか。そのひとつとして FGF 2 の可能性が示唆されている。現在 FGF 2 非存在下における同様の実験も試みているところである。また、先行研究によりギャップ結合の消失と神経細胞の分化との間に何らかの関係があることも示唆されている。培養系は生体内に比べると、細胞・組織の外部環境のコントロールが容易である。今後は培養系を用いて、それら神経化への因子の探索や働きについて解明していきたいと考えている。