



Neurite Outgrowths of Neurons Using Neurotrophin-Coated Nanoscale Magnetic Beads

神経栄養因子を被覆した微小磁気ビーズによる神経細胞の神経線維伸長

(JBB, Vol. 98, No. 5, 348-352, 2004)

仲 祐貴江・北澤 彩子・赤石 幸映・清水 範夫*

細胞の生存と機能の維持、高次機能の制御が可能な細胞の足場となる人工基板の開発が、細胞培養、人工臓器や再生医療などの分野において求められている。本研究では、ナノテクノロジーの生物科学分野への適用の一環として、微小磁気ビーズを用いた神経細胞の基板への固定について検討した。微小磁気ビーズはさまざまなサイズのビーズが入手でき、かつ溶液中での懸濁や回収が容易なので、タンパク質担体として有用である。われわれは、磁石を用いてこの微小磁気ビーズを特定の場所に固定し、機能性を有するパターン化基板を作製するという新規な細胞固定化方法を提案する。

神経栄養因子で被覆した微小磁気ビーズ（直径250 nm）を添加してニワトリ脊髄後根神経節（DRG）神経細胞やPC12h細胞を培養し、微小磁気ビーズにより神経細胞に神経線維を伸長させることが可能かどうかについて調べた。つぎに、神経栄養因子で被覆した微小磁気ビーズと磁石を用いて機能性微小領域を形成させた培養基板上で神経細胞を培養することで、神経細胞を特定領域で固定化する方法を検討した。この研究成果はマイクロ化学分析システムなどに対するセルチップ技術開発分野に応用可能である。

微小磁気ビーズに共有結合させた神経成長因子（NGF）または脳由来神経栄養因子（BDNF）をDRG神経細胞の培養液に添加して、微小磁気ビーズに結合した神経栄養因子の生物活性について検討したところ、NGFまたはBDNFを被覆した微小磁気ビーズは、NGF溶液またはBDNF溶液を培地に添加した場合と同様に神経細胞の神経線維を伸長させた。

神経栄養因子で被覆した微小磁気ビーズと一緒に神経栄養因子の抗体を添加すると、神経線維を伸長した神経細胞数が減少した。これにより、微小磁気ビーズに結合した神経栄養因子は生物活性を有しており、微小磁気ビーズ上でもタンパク質の構造は変化していないと考えられた。

PC12h細胞は培地にNGFを添加すると神経線維を伸長させるが、BDNFを添加してもBDNFレセプターを有していないため神経線維を伸長させない。そこで、NGFとBDNF両方で被覆した微小磁気ビーズをPC12h細胞の培地に添加したところ、PC12h細胞の神経線維を伸長させた。これより、微小磁気ビーズに複数のタンパク質を修飾しても、神経細胞に分化刺激を与えられることが分かった。

直径5 mmの永久磁石と神経栄養因子で被覆した微小磁気ビーズを用いて、特定の領域への神経細胞の固定化を検討した。培養ディッシュの裏底に磁石を3個貼りつけ、その上に神経栄養因子を被覆した微小磁気ビーズを滴下してビーズを固定（磁石領域1-3）し、神経細胞を培養した。その結果、神経細胞は固定化した微小磁気ビーズ上に接着し神経線維を伸長した。培養ディッシュの裏底に磁石がないところでは、微小磁気ビーズと神経細胞はほとんど見られなかった。これより、微小磁気ビーズと磁石を用いることでパターン化した基板の形成が可能であり、さらに微小磁気ビーズに神経栄養因子を被覆することで神経細胞のパターン化した選択的固定が可能であることが分かった（図1）。

本研究において、神経細胞培養時における微小磁気ビーズは、細胞に影響を与えることなくタンパク質担体として利用できることが分かった。また、複数の神経栄養因子を微小磁気ビーズに結合させることにより、さまざまな種類の神経細胞に同時に生存と機能の維持の刺激を与えられる可能性があることを示した。さらに、神経栄養因子で被覆した微小磁気ビーズと磁石を用いることで、培養基板の特定の領域に神経細胞の固定化が可能となった。



図1. 磁石と微小磁気ビーズによる神経細胞の固定

* 著者紹介 東洋大学大学院生命科学研究科生命科学専攻（教授） E-mail: nshimizu@itakura.toyo.ac.jp