

# 培養 PC 12細胞を用いた神経細胞死誘導法の検討

高畑 京也・井内 砂織・物部 啓一<sup>a)</sup>・多田 幹郎<sup>b)</sup>

(生物資源開発学講座)

## Study on Neuronal Cell Death in Cultured PC12 Cells

Kyoya Takahata, Saori Inouchi, Keiichi Monobe<sup>a)</sup>  
and Mikiro Tada<sup>b)</sup>

(Department of Bioresources Chemistry)

Rat pheochromocytoma (PC12 cells) were recently shown to be a useful model for studying the mechanism of cell death and its prevention by different agents. We show here that the diverse reagents of anticancer drugs, protein kinase C inhibitors, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and  $\beta$ -amyloid peptides also induce cell death in PC12 cells. Cell death was detected by released activity of lactate dehydrogenase (LDH) from intracellular to medium. These results prompted us to investigate whether cell death in PC12 cells might be induced by different pathways.

Key words : PC12 cells, neuronal cell death, apoptosis, necrosis, LDH

### 緒 言

近年、我が国の高齢者人口は増加の一途をたどり、高齢者の疾患、特に痴呆疾患の治療や予防に関する研究の重要性が益々高まっている。痴呆疾患はその原因により、脳血管型とアルツハイマー型に大別されているが、いずれの場合にも神経細胞死が大きく関与している。神経細胞死の様式には自滅的な細胞死であるアポトーシスと、偶発的外因による受動的な細胞死であるネクローシスの二つがある<sup>1)</sup>。これまでは、これら二種の細胞死は対立する概念として研究されていたが、近年では、ネクローシスを起す要因とされてきた虚血によってもアポトーシスが起るという報告<sup>2)</sup>もある。また、同一要因及び同一細胞において、その程度によりアポトーシスとネクローシスの両方を起す場合があることも判明している<sup>3)</sup>。このように細胞死の機構は複雑であり、現在も、詳細は不明である。

これら神経細胞死の機構解明のために、現在まで各種の培養神経細胞が研究に利用されているが、とりわけ、ラット副腎髄質由来親クロム性細胞腫 PC 12 細胞は、神経成長因子 (NGF) により神経突起を伸

長して交感神経様細胞へと分化するため、神経細胞のモデル細胞として多くの研究者に用いられている<sup>4),5)</sup>。本研究では、この PC 12細胞に各種神経細胞死誘発剤を添加し、簡便で精度の高い細胞死測定法の確立を検討した。

### 材料と方法

#### 試 薬

細胞死誘導剤として、Etoposide(日本化薬)、Ara-C (日本新薬)、K252a (協和メディクス)、Sphingosine (Serdary Reseach Lab.),  $\beta$ -アミロイドペプチド( $\beta$ 1-40,  $\beta$ 1-42および $\beta$ 25-35; Bachem社)を用いた。また、Camptothecin, Calphostin C, Staurosporine, H-7, Dimethylshingosine, C<sub>2</sub>-Ceramide (N-Acetyl-D-shingosine), C<sub>6</sub>-Ceramide (N-Hexanoil-D-shingosine)並びに Natural

Received October 1, 1997

a) 自然科学研究科生物資源科学専攻

(Department of Regulatory Bioengineering, Graduate School of Natural Science and Technology)

b) 生物機能・遺伝資源開発学

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

ceramide (type III及びtype IV)も細胞死誘導剤として用い、Sigma社より購入した。細胞の増殖能測定にはMTT法の改良法であるWST-1測定キット(和光純薬工業)を使用した。更に、遊離乳酸脱水素酵素(LDH)活性測定は、LDH活性測定キットMTX“LDH”(極東製薬工業)を用いた。Dulbecco's Modified Eagle's medium (D-MEM)および馬血清、牛胎児血清はGibco社製を使用した。細胞核蛍光染色試薬Hoechst 33342はSigma社より購入した。

## 方 法

### ・培養細胞と培養条件

NGFに応答して神経突起を伸長することより、神経のモデル細胞として使用されるラット副腎髄質由来PC12細胞を用いた。細胞は、10%馬血清および5%牛胎児血清を含むD-MEM培地を使用し、10%CO<sub>2</sub>存在下37℃にて培養した。

### ・LDH活性測定法<sup>6)</sup>

PC12細胞を96穴プレートに $1.6 \times 10^3$  cell/well播種し、2日間培養後、各種細胞死誘導剤を添加した。所定時間の処理後、上清の一部をLDH活性測定に供した。活性測定には極東製薬工業(株)のLDH活性測定キットMTX“LDH”を使用した。なお、Tween20により細胞を破碎したものを、100%細胞死とした。なお、本研究で使用した全ての試薬はLDH活性に直接の影響を及ぼさなかった。

### ・WST-1法<sup>6)</sup>

96穴プレートに播種したPC12細胞を各種試薬で処理後、PBS(-)で2回洗浄した。各wellにクレスリンゲル緩衝液100 $\mu$ lと発色試薬(1-Methoxy PMS溶液とWST-1溶液を1:9(v:v)の比で混合したもの)10 $\mu$ lを添加した。37℃、3時間インキュベート後、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)にて450nmの吸光波長を測定した(参照波長:540nm)。なお、細胞増殖率はwellへの細胞播種時を100%とし、検体処理後の相対比率で表した。

### ・形態学的観察

PC12細胞をHoechst 33342<sup>7)</sup>で染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

## 結 果

### 1. LDH法とWST-1法との相関性

PC12細胞において、培地中に放出されたLDH活性の上昇が細胞死の指標となり得るのかどうかを検討する為、細胞増殖の評価などに用いられるMTT改良法であるWST-1法の結果と比較した。PC12細胞において既に細胞死誘導能が報告されているトポイソメラーゼII阻害抗癌剤Etoposideで処理した後、WST-1法による細胞増殖の測定(Fig. 1A)と遊離LDH活性測定(Fig. 1B)を行った。その結果、EtoposideはWST-1法において濃度依存的な生細胞数の減少を引き起こし、LDH活性測定においては濃度依存的なLDHの遊離を誘導した。両パラメーターのプロットにより、細胞増殖能と遊離LDH活性は高い逆相関を示した(Fig. 1C)。このことより、PC12細胞において遊離LDH活性測定により細胞死を判定できることが判明し、以下の細胞死誘導実験には、操作のより簡便な遊離LDH活性測定を細胞死の指標とした。

### 2. Etoposide以外の抗癌剤による細胞死誘導

ヒト急性骨髄性白血病細胞において細胞死誘導能が判明しているトポイソメラーゼI阻害剤Camptothecin<sup>8)</sup>及び代謝拮抗剤Ara-C<sup>9)</sup>について検討した。その結果、PC12細胞においては、Camptothecinにより細胞死が誘導されたが、Ara-Cによっては細胞死がほとんど誘導されなかった(Fig. 2)。

### 3. プロテインキナーゼC(PKC)阻害剤による細胞死誘導

各種の細胞内情報伝達系阻害剤が、細胞死を誘導することが知られている。そこで、PKC阻害剤であるCalphostin C, Staurosporine, K252aおよびH-7についてPC12細胞に対する細胞死誘導を検討した。その結果、Calphostin C, Staurosporine並びにK252aは細胞死を誘導したが、H-7には細胞死誘導能は検出されなかった(Fig. 3)。このことより、同じPKC阻害能を有しながら化合物種により細胞死誘導能の有無に差があることが判明した。

### 4. セラミド誘導体による細胞死誘導

最近、アポトーシスにおけるセラミドの細胞内情報伝達分子としての機能が注目されてきており、アポトーシス誘導への関与も報告<sup>9)</sup>されている。そこでPC12細胞におけるセラミド誘導体の細胞死への影響

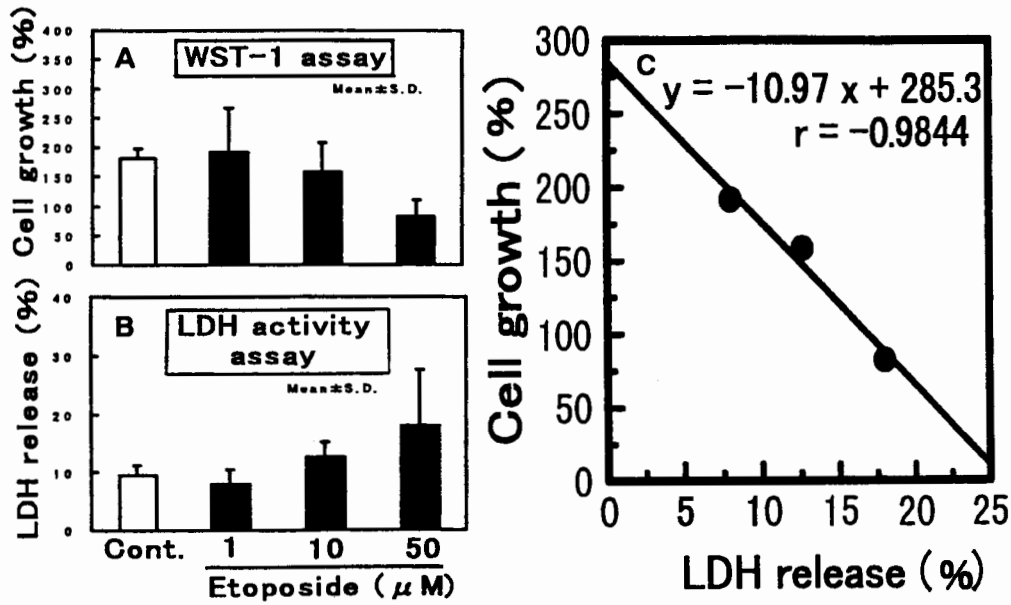


Fig. 1 Relationship between WST-1 assay and LDH activity assay. PC12 cells were exposed to etoposide (1, 10 or 50  $\mu\text{M}$ ), or vehicle (cont.) for 24 h. Panel A: cell growth was determined by WST-1 assay. Panel B: LDH release was determined by LDH activity assay. Panel C: the relationship between cell growth and LDH release was plotted. Values are means  $\pm$  s.d. of three samples.

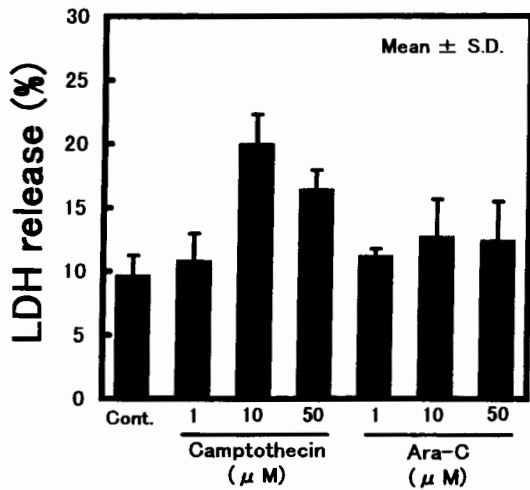


Fig. 2 Effect on LDH release by anticancer drugs. PC12 cells were exposed to camptothecin (1, 10, or 50  $\mu\text{M}$ ), Ara-C (1, 10, or 50  $\mu\text{M}$ ), or vehicle (cont.) for 24 h. LDH release was determined by LDH activity assay. Values are means  $\pm$  s.d. of three samples.

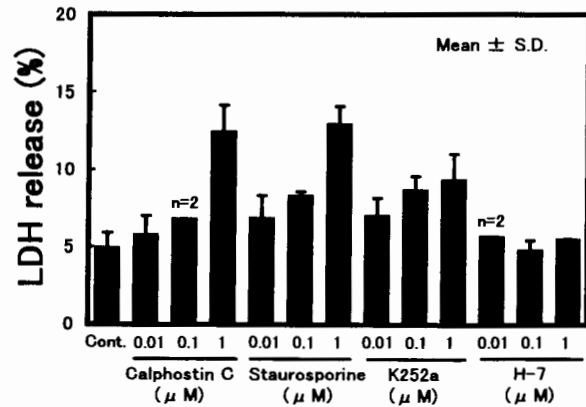


Fig. 3 Effect on LDH release by PKC inhibitors. PC12 cells were exposed to calphostin C (0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{M}$ ), staurosporine (0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{M}$ ), K252a (0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{M}$ ), H-7 (0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{M}$ ), or vehicle (cont.) for 24 h. LDH release was determined by LDH activity assay. Values are means  $\pm$  s.d. of three samples.

を調べた。その結果、各種セラミド誘導体 ( $\text{C}_2$ -ceramide,  $\text{C}_6$ -ceramide, Natural ceramides, Dimethylsphingosine 及び Sphingosine) により細胞死誘導が認められた (結果は示さず)。

### 5. 過酸化水素及び $\beta$ -アミロイドペプチドによる細胞死誘導

中枢神経系細胞障害に関与している活性酸素の一つである過酸化水素の影響を検討したところ、濃度依存的な細胞死が誘発された (Fig. 4)。またアルツハイマー病患者に脳に蓄積し、神経毒性の原因物質として考えられている  $\beta$ -アミロイドペプチド<sup>10)</sup>

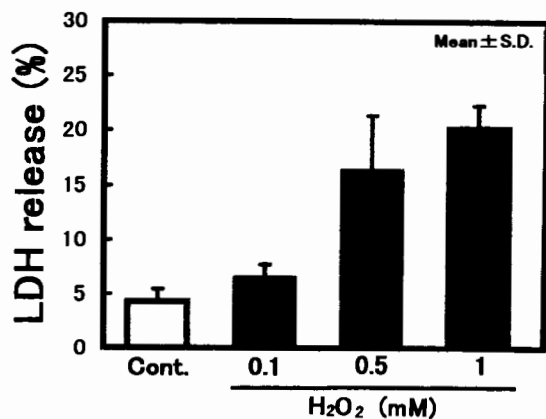


Fig. 4 Effect on LDH release by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PC 12 cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1, 0.5, or 1 mM), or vehicle (cont.) for 24 h. LDH release was determined by LDH activity assay. Values are means ± s.d. of three samples.

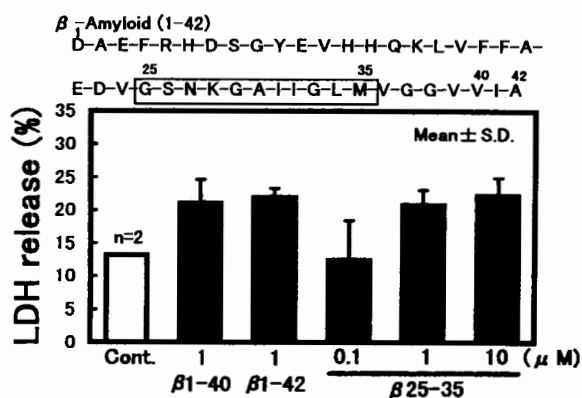


Fig. 5 Effect on LDH release by β-amyloid peptides. PC12 cells were exposed to 40 residues of β peptide (1 μM; β1-40), 42 residues of β peptide (1 μM; β1-42), 25-35 residues of β peptide fragment (0.1, 1, or 10 μM; β25-35) or vehicle (cont.) for 24 h. LDH release was determined by LDH activity assay. Values are means ± s.d. of three samples.

の影響を検討した。その結果、生体内で産生されていると考えられる40残基または42残基 βペプチド共に細胞死が誘導された (Fig. 5)。また、強い神経毒性を有すると考えられている25-35残基の βペプチドフラグメント<sup>11)</sup>によっても PC 12細胞における細胞死が誘導された (Fig. 5)。

## 考 察

本研究は、PC 12細胞を用いた簡便な神経細胞死測定法の確立を目的とした。細胞死誘導剤として、抗癌剤である Etoposide, Camptothecin 及び Ara-C,

また細胞内情報伝達系阻害剤のうち PKC 阻害剤である Calphostin C, Staurosporine, K252a 並びに H-7 を用いた。更に、最近アポトーシスの情報伝達分子として注目されている各種セラミド誘導体のうち C<sub>2</sub>-Ceramide, C<sub>6</sub>-Ceramide, Natural Ceramide, Dimethylsphingosine 及び Sphingosine, また活性化酸素種の一つである過酸化水素, 並びにアルツハイマー病疾患脳に蓄積される β-アミロイドペプチドを用いて、PC 12細胞の細胞死を検討した。その結果、Ara-C と H-7 を除いて全てに細胞死誘導能が確認された。また、蛍光顕微鏡による形態学的観察 (結果示さず) により、この細胞死の様式は、過酸化水素についてはネクローシス, その他の試薬についてはアポトーシスであることが明らかとなった。

以上より、PC 12細胞を用いた各種細胞死誘発剤による *in vitro* での簡便な神経細胞死の評価系が確立された。この評価系は、様々な生理活性物質の神経細胞死に対する効果及び作用機序の検討に有用であり、今後の神経細胞死の機構解明に大いに役立つものと期待される。

## 要 約

【目的】神経細胞死の様式には自滅的な細胞死であるアポトーシスと、偶発的外因による受動的な細胞死であるネクローシスの二つがある。現在、この神経細胞死の機構解明のために、各種の培養神経細胞が研究に利用されているが、とりわけ、ラット副腎髄質由来親クロム性細胞腫 PC 12細胞は、神経細胞のモデル細胞として多くの研究者に用いられている。本研究では、この PC 12細胞に各種神経細胞死誘発剤を添加し、簡便で精度の高い細胞死測定法の確立を検討した。

【方法及び結果】細胞死誘発には抗癌剤、各種の情報伝達阻害剤及びセラミド誘導体などを使用した。細胞死の判定は、細胞死に伴う細胞膜破壊により培養培地中に遊離される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性測定により行った。抗癌剤である Etoposide 及び Camptothecin を 1-50 μM の濃度で処理したところ、両者とも細胞死誘導がみられた。また、プロテインキナーゼ C 阻害剤である K252a, Calphostin C 及び Staurosporine を 24時間処理すると、1 μM で有意の細胞死が認められた。さらに、各種セラミド

誘導体, 過酸化水素並びに  $\beta$ -アミロイドペプチドを24時間処理したところ, 同様に細胞死誘導が認められた。形態学的観察により過酸化水素誘導細胞死はネクロシスであり, それ以外の細胞死はアポトーシスであることが判明した。本研究により, PC12細胞を用いた各種細胞死誘発剤による *in vitro* での簡便な神経細胞死の評価系が確立された。

#### 謝 辞

この研究は平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学学内特別研究『特殊環境生物の機能開発と生物生産への応用』を分担して行ったものである。

#### 文 献

- 1) Katzman, R. and T. Saitoh : Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J.*, **5**, 278-286 (1991)
- 2) Deshpande, J., K. Bergstedt and T. Linden : Ultrastructural changes in hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against program cell death. *Exp. Brain Res.*, **88**, 91-105 (1992)
- 3) Duvall, E. and A. H. Wyllie : Death and the cell. *Immunol. Today*, **7**, 115-119 (1986)
- 4) Greene, L. A. and A. S. Tischler : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2424-2428 (1976)
- 5) Greene, L. A. and A. S. Tischler : PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. *Adv. Cell Neurobiol.*, **3**, 373-414 (1982)
- 6) 田沼靖一 : 細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ・アポトーシス実験プロトコール. pp.154-157, 秀潤社, 東京 (1994)
- 7) 田沼靖一 : 細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ・アポトーシス実験プロトコール. pp.96-97, 秀潤社, 東京 (1994)
- 8) Kaufmann, S. H. : Induction of Endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anti-cancer drugs: A cautionary note. *Cancer Res.*, **49**, 5870-5878 (1989)
- 9) Jarvis, W. D., F. A. Fornari, Jr., R. S. Traylor, H. A. Martin, L. B. Kramer, R. K. Erukulla, R. Bittman and S. Grant : Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8275-8284 (1996)
- 10) Behl, C., J. B. Davis, F.G. Klier and D. Schubert : Amyloid  $\beta$  peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.*, **645**, 253-264 (1994)
- 11) Yankner, B. A., L. K. Duffy and D. A. Kirscher : Neurotrophic and neurotoxic neuropeptides. *Science*, **25**, 279-282 (1990)