

ヒト神経芽細胞種由来細胞(SH-SY5Y 細胞)に対する TrkB アゴニストペプチド(製品コード:PG-003)の神経突起伸長効果

脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)は、標的細胞表面上にある特異的受容体 TrkB に結合し、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などの神経細胞の成長を調節する脳細胞の増加には不可欠な神経栄養因子の一つであり、脳や末梢での存在が確認されております [1]。BDNF は神経細胞の機能維持において重要な役割を持ち、その減少は、認知症を含むさまざまな神経性疾患の発症と関連している事が提唱されており、これらの疾患メカニズムの研究における有用性が示唆されています [2, 3]。

BDNF 等の神経栄養因子の作用により神経細胞は神経突起を伸長することが知られています [4]。今回、ヒト神経芽細胞由来 SH-SY5Y 細胞を用いて、弊社製品である TrkB アゴニストペプチド(製品コード:PG-003)が、遺伝子組換え体 BDNF と比較して、ほぼ同様に神経栄養因子としての機能する事を確認しましたので、詳細な手順と実験条件をご紹介します(本評価試験は、原則的に既報 [5] に従って実施されました)。

● 準備物:

1) 細胞

細胞:	SH-SY5Y (ヒト神経芽細胞腫由来)
入手先:	ECACC(Cat. No. 94030304)

2) 培地及び添加因子

増殖培地:	DMEM/F12 (1:1) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)
分化培地 1:	DMEM/F12 (1:1) + 2.5% FBS + 10 μ M Retinoic acid (RA) + 1% P/S
分化培地 2:	DMEM/F12 (1:1) + 1% FBS + 10 μ M RA + 1% P/S
分化培地 3:	Neurobasal medium + 1x B27 + 1% GlutaMax + 10 μ M RA + 1% PS + recombinant BDNF (rBDNF) or TrkB agonist peptide (PG-003)
細胞剥離液:	0.05% Trypsin-EDTA

3) 試薬の詳細情報

試薬名	Cat. No.	メーカー
DMEM (1.0 g/l Glucose) with L-Glutamine and Sodium Pyruvate, liquid (DMEM)	08456-65	ナカライテスク
Ham's F-12 Nutrient Mix (F12)	11765054	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum, certified, United States (FBS; 56°Cで 30 分間非働化して使用)	F7524	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (P/S)	09367-34	ナカライテスク

B-27 Supplement (50X), serum free (B27)	17504044	Thermo Fisher Scientific
GlutaMAX Supplement	35050061	Thermo Fisher Scientific
Neurobasal Medium	21103049	Thermo Fisher Scientific
Brain-derived neurotrophic factor (recombinant, human)	B3795	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	25300054	Thermo Fisher Scientific
Poly-D-lysine hydrobromide (Poly-D-lysine)	P7280	Sigma-Aldrich
D-PBS, no calcium, no magnesium (PBS (-/-))	14190144	Thermo Fisher Scientific
D-PBS (+) Preparation Reagent (Ca, Mg Solution) (100 x)	02492-94	ナカライテスク
Neurite Outgrowth Staining Kit	A15001	Thermo Fisher Scientific

4) 器具・機器の詳細情報

器具・機器名	Cat. No.	メーカー
Cell/Tissue Culture Flask 75 Filter Cap (T-75 flask)	MS-23250	住友ベークライト
μ-Plate 24 Well Black ID 14 mm (24 well black plate)	82426	ibidi GmbH
OneCell Counter	BMS-OCC01	バイオメディカルサイエンス
PROKEEP protein low binding tube 1.5 mL (1.5 mL タンパク質低吸着チューブ)	PK-15C-500	Watson
マルチガスインキュベーター	APM-30DR	ASTEC
位相差培養顕微鏡	CKX53	オリンパス
Operetta CLS High-Content Analysis System (Operetta CLS)	HH16000000	Perkin Elmer
Harmony High-Content Imaging and Analysis Software (ver. 4.6) (Harmony Software)	HH17000001	Perkin Elmer

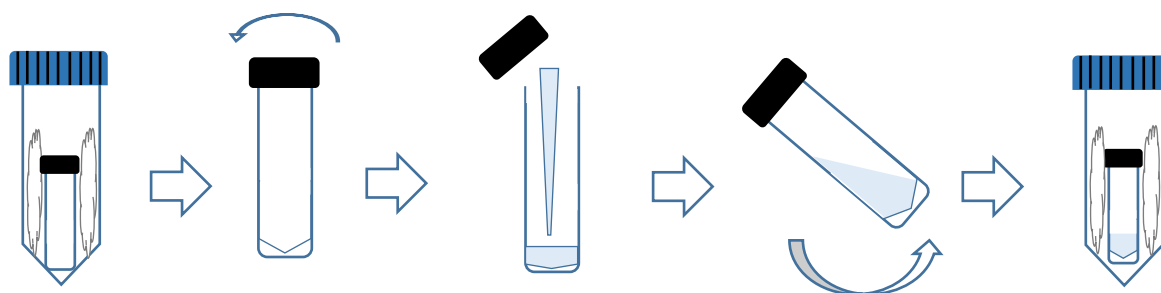
● 方法:

- 以下の主な操作はクリーンベンチや安全キャビネット等内の無菌環境下で行った。
- TrkB アゴニストペプチド(PG-003、内容量 10 μ g)のバイアルを遠心し、ペプチドを底部に集めた。その際、バイアルはガラス製である事から、バイアル瓶全体が柔らかな緩衝材質物で包まれる様にし破損しない様に注意する(下図①)。
- スクリュウキャップを静かに回して開封し(下図②)、ピペットとピペットチップにて内容物のペプチド全量(10 μ g)を 350 μ L の上記の分化培地 3(基礎培地)に溶解する。(下図③)。本操作により、TrkB アゴニストペプチド濃度として 5.55 μ M(28.6 μ g/mL)の溶液となる (PG-003 Stock 溶液)。
- バイアルにキャップをしっかりと締めつけ、ボルテックスにより溶解する。この際、ペプチドは微量であり目視での確認ができない為、添加した液でバイアル底部及び内壁をしっかりと浸漬させる(下図④)。
- ピペットチップの先端でペプチド溶解液をバイアル瓶の底部に集めるようにするか、または必要に応じて、溶解液が入ったバイアルを再度遠心し、溶液を底部に集める(下図⑤)。
- PG-003 Stock 溶液 (ペプチド濃度: 28.6 μ g/mL=5.55 μ M) を分化培地 3(基礎培地)で処理濃度(0, 9.55, 28.65 ng/mL = 0, 1.85, 5.55 nM)まで希釈して使用。rBDNFについても同様に分化培地 3(基礎培地)で処

理濃度(0, 50, 150 ng/mL = 0, 1.85, 5.55 nM)まで希釈して使用する。

- 7) 初回使用分以外は、1.5 mL タンパク質低吸着チューブに 40 μ L ずつ分注し、-80°C保存する。
- 8) 初回培地交換時は、Stock 溶液調製直後の非凍結品を使用。その後の培地交換では、都度新しい Stock 溶液を解凍して使用。

- ① 遠心処理
- ② キャップ開封
- ③ 溶媒添加
- ④ 底部及び内壁を浸漬
- ⑤ 遠心処理



- 9) 細胞培養及び神経細胞分化：細胞は、以下の工程に従って、低酸素条件を設定したマルチガスインキュベーター (5% CO₂, 3% O₂, 37°C, 湿潤) 内で培養した。

工程	培地	培養器	期間
前培養	増殖培地	T-75 flask	70~80% コンフルエントまで
分化 1	分化培地 1	T-75 flask	3 日間
分化 2	分化培地 2	T-75 flask	3 日間
継代	分化培地 2	Poly-D-Lysine coated 24 well plate	継代後 1 日間
分化 3	分化培地 3	Poly-D-Lysine coated 24 well plate	10 日間 (3 日毎に培地交換)

- 10) 神経突起伸長試験：分化 3 終了後、Neurite Outgrowth Staining Kit を用いて神経細胞膜および核の染色を行った。染色方法はキットのプロトコルに従った。染色後、Operetta CLS high-content analysis system を用いて蛍光写真撮影を行った。
- 11) 画像解析と統計解析：得られた画像データは、Harmony software を用いて解析・定量し、細胞体数当たりの神経突起長を算出した。実験は N=3 で行い、陰性対照区と比較する Student's T-test (両側検定, 対応無し) において、 $p < 0.05$ 未満のものを有意と判定した。

- 結果：神経突起伸長試験における対物 5 倍の蛍光顕微鏡画像(画像解析対象, 1 wellにつき 9 視野撮影したうちの 1 視野) と対物 10 倍の蛍光顕微鏡画像(1 wellにつき 25 視野撮影したうちの 1 視野; 未解析) を示す(図 1 及び図 2)。

rBDNF 添加条件と同様に、PG-003 添加条件において、神経突起長の伸長が認められた(図 1 及び 2)。さらに、画像解析による細胞体当たりの神経突起長の算出結果を図 3 及に示す。被験物質を問わず、いずれの処理濃度においても、陰性対照と比べ、有意に細胞体当たりの神経突起長が増加した(図 3)。

図 1. ヒト神経芽細胞腫由来細胞の神経突起伸長の蛍光顕微鏡下画像 (対物5倍)

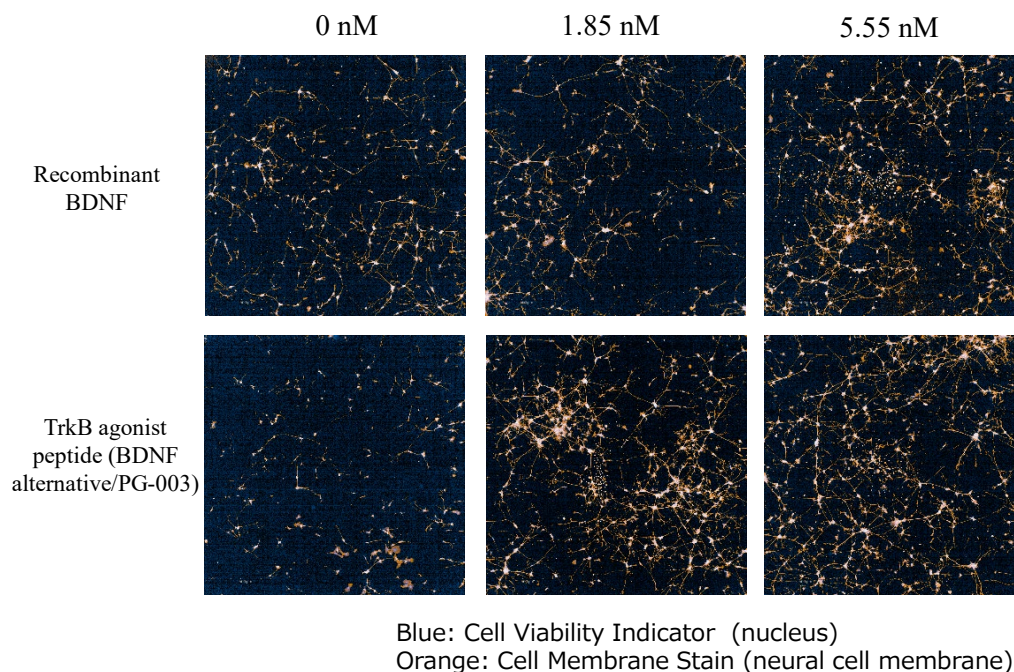


図 2. ヒト神経芽細胞腫由来細胞の神経突起伸長の蛍光顕微鏡下画像 (対物10倍)

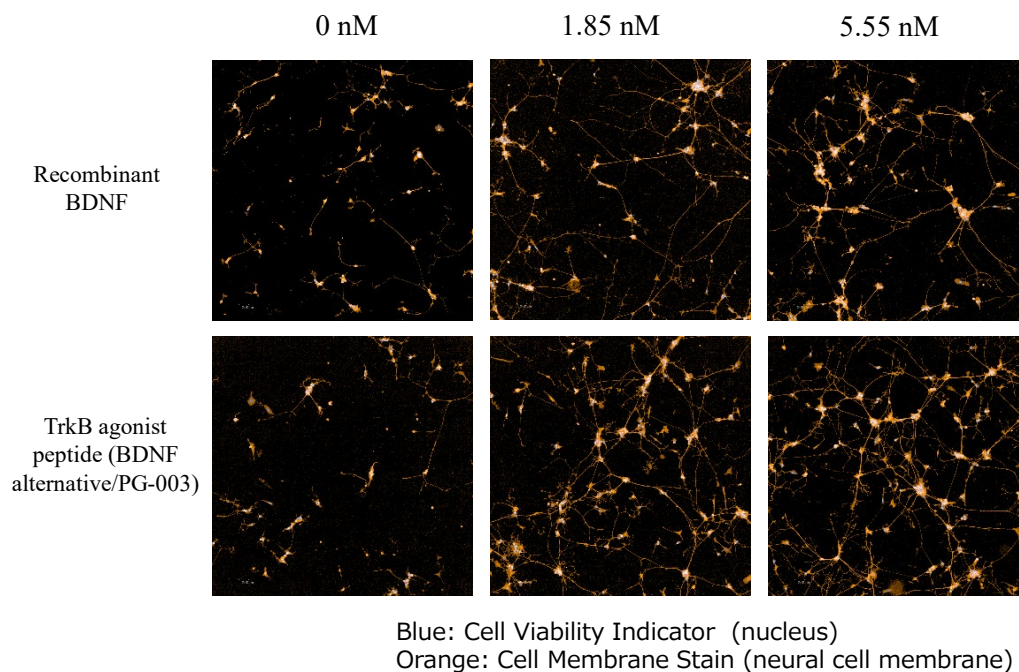
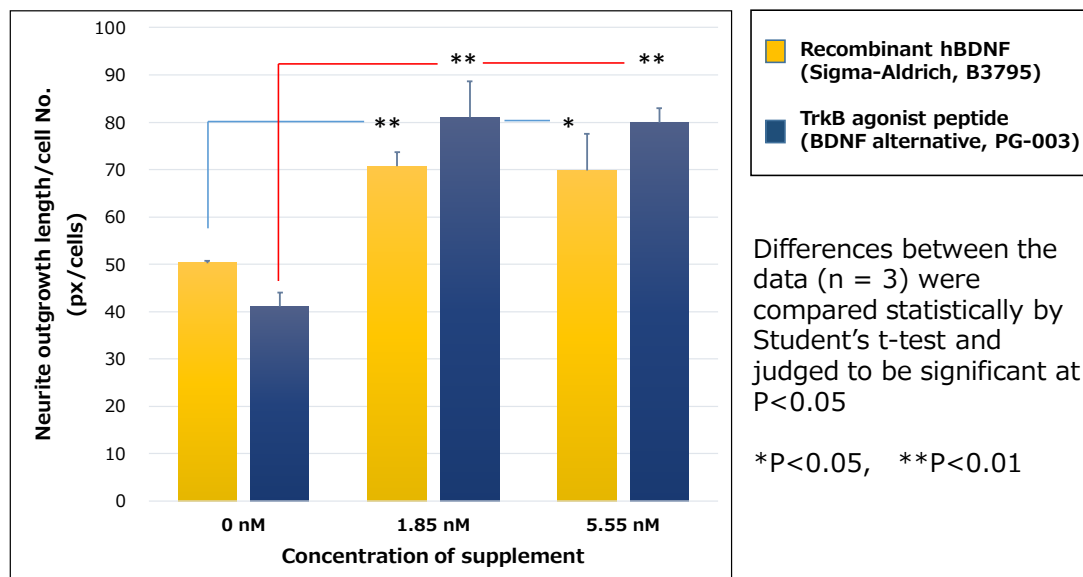


図3. rBDNF及びTrkBアゴニストペプチド (PG-003) によるヒト神経芽細胞腫由来細胞の神経突起伸長への影響比較



● 参考文献:

- 1) Binder DK & Scharfman HE. Growth Factors 2004; 22: 123-131.
- 2) Tapia-Arancibia L, *et al.* Brain Res Rev. 2008; 59: 201-220.
- 3) Brunoni AR, *et al.* Int J Neuropsychopharmacol. 2008; 11: 1169-1180.
- 4) Iwasaki K, *et al.* Int J Dev Neurosci. 1998; 16: 135-145.
- 5) Shipley MM, *et al.* J Vis Exp. 2016; 17: 53193.

● 本製品(ペプチド)に関する注意事項:

- 本製品の使用に関しては、Safety Data Sheet(SDS)をよくご確認の上でご使用下さい。
- 本製品は溶解後速やかにご使用される事を推奨します(上記の本製品の分注・凍結保存に関する手順は試験の一例です。溶解後の安定性については弊社または販売代理店にお問合せ下さい)。
- 本製品は研究用試薬です。研究目的以外には使用できません。
- 本製品の仕様や内容量、外観等は予告なしに変更する事があります。
- 大容量品、その他の特殊仕様品をご希望の場合は弊社または販売代理店へお問合せ下さい。

《製品及びアプリケーションノートに関するお問い合わせ先》

ペプチグロス株式会社

TEL : 070-4503-1497

E-mail : contact@peptigrowth.com