

## パルス磁場刺激依存性神経細胞分化における 神経突起形成制御機構の分子生物学的解析

### [1] 組織

代表者：工藤 忠明

(東北大学大学院歯学研究科)

対応者：望月 研太郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

金高 弘恭 (東北大学大学院歯学研究科)

高木 敏行 (東北大学流体科学研究所)

出江 紳一 (東北大学大学院医工学研究科)

研究費：物件費29万7千円，旅費0円

### [2] 研究経過

超高齢社会を迎えた日本では、脳卒中の後遺症や脊髄損傷の四肢麻痺に苦しむ患者数は200万人を超え、脳や脊髄損傷後の運動機能回復治療への需要は大きくなるばかりである。近年、脳を直接刺激する経頭蓋磁気刺激が脳卒中片麻痺の治療手段として有望視されている(Izumi et al. 2008)が、磁気刺激による神経回路再編成の機序は不明点が多い。

筆者らはこれまで、培養用プレート下にセットした励磁コイルによるパルス磁場刺激(中心部磁束密度700mT、12時間/日)が、MEK-ERK1/2経路を活性化させ、神経分化モデルのラット副腎髄質由来PC12細胞の神経細胞分化を誘導することを示した(Kudo et al. 2013)。しかし励磁コイルを用いたパルス磁場によるMEK-ERK1/2経路の活性化機構は依然不明点が多い。このような背景の下、本共同研究では、パルス磁場刺激をPC12細胞等の神経分化モデル細胞に作用させ、パルス磁場や励磁コイルの温熱作用による神経突起伸長の調節機構について、損傷神経回路のバイパス形成促進の観点から更に検討した。研究打合せは、研究期間中毎月実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本共同研究では、励磁コイルを用いた電磁気学的刺激が神経細胞分化を誘導するメカニズムをより深く理解するため、励磁コイルまたは加熱プレートを用い、下記方法により細胞外部環境からの温熱作用が

PC12細胞

の増殖や神経細胞分化に与える影響を検討し、以下の成果を得た。

〔方法〕培養用プレート内の培地

温度と励磁コイルまたは加熱プレートの表面温度との関係の評価した。培養用プレート中の培地は、神経細胞分化誘導に使用する強度のパルス磁場刺激操作か、様々な温度に設定した加熱プレートによる加温操作を最大1日18時間(3時間×6回)受けた。その後、位相差顕微鏡を用いて細胞の増殖や神経細胞分化度を評価した。

〔成果〕励磁コイル操作時のコイル表面温度上昇による培地温度上昇は、最大で約1°Cであった。この培地温度上昇は加熱プレートの表面温度を39.5°Cに設定することでほぼ再現できた。加熱プレートにて再現した温度刺激(3時間温熱刺激を1日あたり最大6回)を、以下 temperature-controlled repeated thermal stimulation, TRTS と呼ぶ。このTRTS(39.5°C)では、PC12細胞の増殖曲線には全く影響を及ぼさなかった。また、励磁コイルを用いたパルス磁場刺激時ほどではないものの、神経突起誘導を有意に誘導した。さらに、PC12細胞の機能的神経細胞分化マーカーとして知られる、アセチルコリンエステラーゼ活性もTRTS(39.5°C)により有意に上昇した。加熱プレートの表面温度を42°Cに設定した場合は、TRTS処理により温熱刺激を受けた細胞は翌日にはほとんどが死滅した。一方でTRTS(39.5°C)依存性の神経突起形成の程度は、この温熱刺激を负荷した1日当たりの合計時間依存的にして増加した(図)。またTRTS(39.5°C)がもたらす温熱作用によるPC12細胞の神経細胞分化は、ERK経路やp38経路の抑制により阻害された。これらの結果は、パルス磁場そのものの成分とは別に、プログラムされた励磁コイル刺激などで発生するTRTS

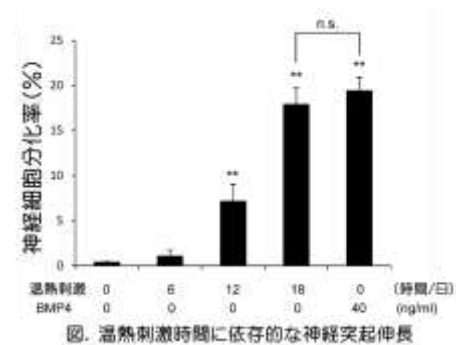


図. 温熱刺激時間に依存的な神経突起伸長

のような精密な温熱刺激も神経突起誘導に貢献できることと、PC12細胞においてERK1/2経路およびp38経路がそれぞれTRTS依存性神経突起形成の誘導に必須の役割を担うことを示唆する(Kudo et al. 2015)。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究成果は、関連領域研究者の医工連携を強力に促進すると考えられる。また本共同研究で明らかとなった精密にコントロールされた温熱刺激による神経突起伸長促進作用に関する研究成果は、損傷を受けた神経回路のバイパス形成促進の観点から今後の更なる発展が強く期待される。

### [4] 成果資料

- (1) Induction of neurite outgrowth in PC12 cells treated with temperature-controlled repeated thermal stimulation. Tada-aki Kudo, Hiroyasu Kanetaka, Kentaro Mochizuki, Kanako Tominami, Shoko Nunome, Genji Abe, Hiroyuki Kosukegawa, Toshihiko Abe, Hitoshi Mori, Kazumi Mori, Toshiyuki Takagi, Shin-ichi Izumi. *PLOS ONE*, 2015 (*in press*)
- (2) Regulation of neuritogenesis in PC12 cells by temperature-controlled repeated thermal stimulation. Tada-aki Kudo, Hiroyasu Kanetaka, Kentaro Mochizuki, Kanako Tominami, Shoko Nunome, Toshiyuki Takagi, Shin-ichi Izumi. 第92回日本生理学会, 神戸, 2015
- (3) Investigation of hyperthermic effect on neuronal differentiation and cell growth in PC12 cells. Tada-aki Kudo, Hiroyasu Kanetaka, Kentaro Mochizuki, Kanako Tominami, Toshihiko Abe, Hitoshi Mori, Kazumi Mori, Genji Abe, Toshiyuki Takagi, Shin-ichi Izumi. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 仙台, 2014