

課題番号 17

温度制御式繰り返し温熱刺激依存性神経細胞分化における 神経突起形成誘導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10万0千円，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。神経突起形成は機能的な神経回路の発達や損傷後の神経系の再生における必須のプロセスである。温熱療法は、安全な癌治療の開発・実践の観点から注目を受けているが、一方で、一過性の細胞加熱(ヒートショック)が神経細胞の保護作用を発揮する可能性が報告されている。しかし、精密な温度制御下での繰り返し温熱刺激(temperature-controlled repeated thermal stimulation, 以下、TRTS と略す)が神経細胞分化に与える影響を与えるかについての研究は、世界的にもこれまでほとんど行われていない。

申請者らは最近、精密なガラス製加熱プレートを用いた神経分化モデルのラット副腎髄質由来 PC12 細胞株に適用し、TRTS が神経突起形成を誘導することを解明した(*Plos One*, Kudo et al. 2015)。しかし、TRTS による細胞内シグナル経路活性化機構は依然不明点が多い。このような背景の下、本計画では、TRTS による神経突起伸長の調節機構について、損傷を受けた神経回路における、より副作用の少ないソバイパス形成促進法開発の観点から更なる検討を行った。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、表面温度制御が可能なガラス製加熱プレートを用いた精密な温度制御下での繰り返し温熱刺激 (TRTS) 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、下記方法により細胞外部環境からの温熱作用が神経細胞

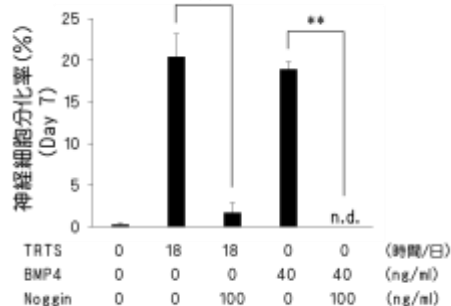


図. BMP阻害剤NogginによるTRTS依存性神経分化の抑制

分化モデル・ラット PC12 細胞の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] 加熱プレートの上に PC12 細胞を播いた培養プレートを設定し、TRTS により細胞培養用の培地が約 39 度になるように 1 日計 18 時間 (3 時間 × 6 回) 加熱し、神経細胞分化を誘導した。その後、位相差顕微鏡を用いて形態的な神経細胞分化率を評価した。その際、各種シグナル阻害剤を併用し、TRTS がいかなるシグナル経路を活性化し神経突起伸長を誘導するのかを評価した。

[成果]

(1) TRTS が PC12 細胞の神経突起を誘導する細胞内シグナル伝達経路はそのほとんどが不明であるが、MAP キナーゼファミリーについては、これまでに明らかになっていた ERK 経路のみならず、p38 経路も必須の役割を担うことが、p38 阻害剤 SB203580 を用いた実験により新たに明らかとなった。

(2) TRTS を受容して活性化される受容体の候補として、温度など物理的な細胞外刺激を受容し活性化されるイオンチャネルファミリーの一つである TRP チャネルファミリーについて検討した。その結果、TRP チャネルファミリーのうち少なくとも TRPV3、TRPV4、TRPV6、TRPC1、TRPC3、TRPC5、TRPC6、TRPM2、TRPM3、TRPM7、TRPM8、TRPP2 は、TRTS による PC12 細胞の神経細胞分化には関与

していない可能性が高いことが、TRP ファミリー各受容体のシグナル阻害剤として HC067047、2-APB、Icilin 等を用いた実験により明らかとなった。

(3) 次に、BMP(骨形成タンパク質)受容体の阻害剤である LDN-193189 や、BMP2・BMP4 等の競合的阻害剤 Noggin を用いることにより (図)、意外にも、PC12 細胞の TRTS 依存性神経細胞分化がほぼ完全に抑制されたことから、TRTS が何らかの形で BMP シグナル伝達経路を活性化し、ERK 経路・p38 経路の活性化や、神経細胞分化を誘導する可能性が明らかとなった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究成果は、関連領域の研究者間における医工連携を強力に推進すると考えられる。また本共同研究で明らかになった TRTS による神経突起伸長促進作用に関する成果は、損傷を受けた神経回路における、より副作用の少ないバイパス形成促進法開発の観点から今後の更なる発展が強く期待される。

なお、本共同研究の成果の一部は、本学学際フロンティア研究所・領域創成研究に発展した。

[4] 成果資料

(1) Kudo T, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Nunome S, Abe G, Kosukegawa H, Abe T, Mori H, Mori K, Takagi T, Izumi S. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells treated with temperature-controlled repeated thermal stimulation. *PLoS One*. 2015. **10**(4): e0124024. doi: 10.1371/journal.pone.0124024.

(2) 工藤忠明, 金高弘恭, 板垣祐介, 布目祥子, 高木敏行, 出江紳一. 神経細胞分化誘導における温度制御式反復温熱刺激の効果の検討. 第74回矯正歯科学会大会, 福岡, 2015.

(3) Kudo T, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Nunome S, Takagi T, Izumi S. Regulation of neuritogenesis in PC12 cells by temperature-controlled repeated thermal stimulation. 第92回日本生理学会, 神戸, 2015.

(4) Kudo T, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Abe T, Mori H, Mori K, Abe G, Takagi T, Izumi S. Investigation of hyperthermic effect on neuronal differentiation and cell growth in PC12 cells. The 5th international symposium for interface oral health science, 仙台, 2014

(5) Kudo T, Kanetaka H, Shimizu Y, Abe T, Mori H, Mori K, Suzuki E, Takagi T, Izumi S. Induction of

neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. *Cell Struct. Funct.* 2013. **38**(1): 15-20.