

## 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30万0千円，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過程である。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)が神経細胞分化に及ぼす影響を与えるかについての研究は、世界的にみてもこれまでほとんど行われてこなかった。

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・ラット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(Kudo et al., *PLOS ONE*, 2015)。しかし、TRTSによるPC12細胞以外の細胞株への影響については、不明点が多い。このような背景の下、本計画では、TRTSを新たに神経分化モデル・マウスNeuro2a細胞株に負荷し、TRTSによる神経細胞分化誘導効果およびそのメカニズムをさらに検討することを目的とし、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更なる検討を行った。研究打合せは、研究期間中、合計15回以上(メール会議を含む)実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本共同研究では、表面温度の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、すなわちTRTSが神経細胞分化を誘導する分子生物学的メカニズムおよび汎用性等を

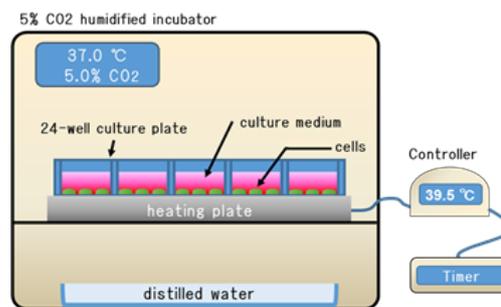


図1. 本研究における温熱刺激法の模式図

より深く理解するため、下記の方法により細胞外部環境からの温熱作用が神経細胞分化モデル・マウスNeuro2a細胞における神経突起伸長プロセスに与える影響を検討し、以下の成果を得た。

[方法] TRTSを行うため加熱プレートを使用し、温度が変化する加熱プレートと培地温度との関係を観察した。増殖もしくは分化誘導培地に播種した神経分化モデルであるマウスNeuro2a神経芽細胞株には、加熱プレート(図1)を用い、2つの異なる温度設定にてTRTS処理(最大18時間/日)が行われた(加熱プレートの表面温度:39.5及び42°C)。その後、細胞増殖や神経突起形成の程度を評価した。BMP2やレチノイン酸とTRTSとの同時処理も検討した。

#### [成果]

(1) 細胞増殖試験において、培地の種類(増殖培地(DMEM+10%FBS)と分化誘導培地(DMEM+2%FBS))によらず、マウスNeuro2a細胞における39.5°CのTRTS処理は、対照群と比較して細胞増殖率に影響を与えないことが示された。

(2) 細胞増殖試験において、39.5°CのTRTSとは

対照的に、42°Cの TRTS 処理はマウス Neuro2a 細胞においても、ラット PC12 細胞と同様、著しい細胞毒性が認められた。すなわち、細胞増殖アッセイにおける 18 時間/日で 42°Cの TRTS 処理後、ほぼすべての Neuro2a 細胞第 6 日目までに死滅した。このことは、TRTS 処理を実施する際の温度条件の微調整の重要性を示唆している

(3) Neuro2a 細胞は、PC12 細胞と異なり、39.5°C の TRTS 単独処理では、神経突起形成が誘導されにくいことが明らかとなった。このことより、TRTS に対する細胞の感受性は、細胞により異なることが推定され、同時に TRTS の感受性に関するシグナル分子の存在を暗示する。ただし、Neuro2a 細胞は、無刺激でも神経突起を伸長させる能力が高いため、この点については PC12 細胞との比較を行う上で、留意が必要である。

(4) しかしながら、TRTS 処理は、マウス Neuro2a 細胞において、BMP2 およびレチノイン酸依存的な神経細胞分化を有意に促進することが示された。このことは、TRTS 処理により活性化されるシグナル経路が、BMP2 やレチノイン酸依存性に活性化される経路とクロストークする未知のメカニズムの存在が推測される。

以上より、われわれは、2 つの異なる温度設定による TRTS の、マウス Neuro2a 細胞における細胞増殖や分化における新しい効果について検討し、その特徴をはじめて明らかにした。特に、細胞毒性のない TRTS 処理 (39.5°C) は、PC12 細胞とは異なり、単独では当該細胞において神経突起伸長作用を発揮しないものの、BMP2 またはレチノイン酸のような他の液性因子を併用することにより、神経突起形成を有意に促進できることを明らかにした。

#### (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 Neuro2a 細胞や PC12 細胞の神経突起伸長を促す、TRTS 作用を裏打ちするメカニズムやその直接的な標的シグナル分子に対する更なる研究は非常に有益で、精密にプログラムされた TRTS のようなマイルドな温度刺激を用いた温熱療法の分化誘導療法や再生医学へ将来的な応用への促進をもたらすことが期待できるものと考えられる。

なお、本共同研究のこれまでの成果の一部は、本学学際フロンティア研究所・領域創成研究 (本年度終了) に発展した。

#### [4] 成果資料

(1) 工藤忠明, 望月研太郎, 泉正之, 渡辺圭, 野口拓也. 温度制御式反復温熱刺激による神経細胞分化調節機構の解析. 平成28年度学際科学フロンティア研究所成果報告会, 仙台, 2017.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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

(6) 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.