

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：林 陽平
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：
野口 拓也 (東北大学大学院薬学研究科)
望月 研太郎 (東北大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 10 万円

[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による身体の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・実践の観点からなお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反復性温熱刺激 (**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いない。

申請者らはこれまでに、精密なガラス製加熱プレートを神経分化モデル・ラット副腎褐色細胞由来 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 (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や TRTS により活性化される細胞内シグナル伝達経路については、不明点が多い。このような背景の下、本計画では、第一に、TRTS を新たに神経分化モデル・ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞株に負荷し、同細胞における TRTS による神経細胞分化誘導効果の有無をさらに検討することを目的とする実験を行った。第二に、TRTS により神経突起が伸長する PC12 細胞において活性化するシグナル伝達経路の解明を目的とする実験を行った。研究打合せは、研究期間中、合計 10 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、即ち TRTS が神経細胞分化を誘導する分子生物学的機序及び汎用性等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

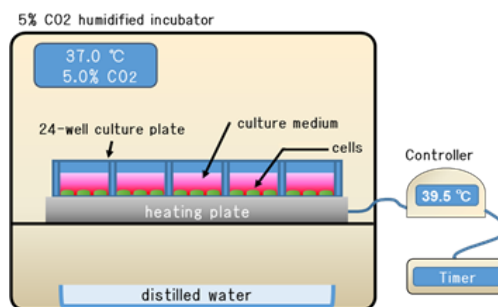


図1. 本研究における温熱刺激法の模式図

熱作用が SH-SY5Y 細胞及び PC12 細胞における神経突起伸長プロセスに与える影響やそのシグナル伝達経路に与える影響を検討し、主に以下の成果を得た。

[方法]

(1) TRTS を行うため、表面温度の制御が可能な加熱プレート (図 1) を使用し、加熱プレートと培地温度との関係を観察した。増殖培地または分化誘導培地に播種した神経分化モデルである SH-SY5Y 神経芽細胞には、2 つの異なった加熱プレートの温度設定にて TRTS 処理 (3 時間×6 回/日、6~7 日間) を実施した (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。

(2) PC12 細胞については、様々なシグナル伝達阻害剤を用いこれまでに確立した TRTS 依存性神経細胞分化誘導に関与する新たなシグナル経路を検討した。

[成果]

(1) 増殖培地 (DMEM + 10% 人工血清) を用いた細胞増殖試験において、ヒト SH-SY5Y 細胞における 39.5°C の TRTS 処理は、マウス Neuro2a 細胞と同様、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処理はヒトSH-SY5Y細胞においても、マウスNeuro2a細胞やラット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、大部分のSH-SY5Y細胞が第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すものである。

(3) SH-SY5Y細胞は、PC12細胞とは異なり、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。この結果は、以前、われわれがマウスNeuro2a細胞において得た結果と同様であった。しかしSH-SY5Y細胞では、TRTSがレチノイン酸依存性神経突起伸長を促進する作用も認められなかったため、この点はNeuro2a細胞の場合と異なる結果となった。

以上(1)~(3)により、われわれは、2つの異なる温度設定によるTRTSの、SH-SY5Y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。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の感受性に関与するシグナル分子の存在を暗示する。ただし、SH-SY5Y細胞は、Neuro2a細胞と同様、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細胞と比較する上で、留意が必要である。また、TRTSプログラムは2種類を試したに過ぎず、今後さらに多様な条件を検討する余地がある。

(4) 一方、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多くが未解明である。今回の研究により、MAPキナーゼファミリーについては、これまでわれわれが明らかにしていたERK活性とp38活性のみならず、ERK5の酵素活性もTRTS依存性神経突起伸長に必須の役割を担うことが、ERK5阻害剤BIX02189を用いた実験により明らかとなった。さらに、JNK阻害剤SP600125をTRTS刺激と併用することにより、TRTS依存性神経突起伸長がむしろ促進されることが明らかとなった。

(5) MAP3Kファミリーについては、これまでどの分子がTRTS依存性神経突起伸長に関与するのか、全く不明であったが、今回の研究により、TAK1がMAP3KとしてTRTS依存性神経突起伸長に必須の役割を担うことが、TAK1阻害剤5Z-7-Zeaeinolを用いた実験により示唆された。

以上(4)~(5)のPC12細胞を用いた検討により、TRTS依存性神経分化には、MEK1-ERK経路、TAK1-p38経路及びMEK5-ERK5経路が神経突起伸長に対し促進的に、一方でJNK経路がこれに抑制的に作用していることが示唆された。よって、TRTS

による神経分化誘導の一層の効率化と応用を図る上で、重要な知見が得られたものと考えられる。

(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促進するものと考えられる。またPC12細胞の神経突起伸長を促す、TRTS作用を裏打ちする機序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大変に有益で、精密にプログラム制御されたTRTSやこれに準ずるマイルドな温度刺激を用いた温熱療法分化誘導療法や再生医学への将来的な応用を可能にするものと期待される。

[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.