

温度制御式反復性温熱刺激 (TRTS) によるより効率的な 神経細胞分化誘導法の開発

[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 拓哉 (東北大学院薬学研究科)

泉 哲 (東北大学大学院歯学研究科)

富並 香菜子 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

既に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を患う患者数は200万人を超える。そのため、脳や脊髄損傷後の運動機能回復治療への需要は増大する一方である。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再生において必要不可欠な過程である。温熱療法は、安全ながん治療の開発・実践の観点から依然として注目されているが、一方で、細胞への一過性の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も報告されている。しかし、精密な温度制御下における反復性温熱刺激 (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は、その多くが依然として不明である。

申請者らはこれまでに、精密な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 を負荷することで神経突起形成を誘導できることを明らかにした (*Plos One*, Kudo et al. 2015, 図 1)。しかし、TRTS による遺伝子の初期応答や細胞内シグナル伝達経路の活性化機構は依然不明点が多い。また、TRTS の温度刺激プログラムを改良することでさらに分化誘導効率を高められる可能性がある。このような背景の下、本計画では、TRTS 研究を有効に前進させるため、TRTS 依存性神経細胞分化研究用モデル細胞株として、PC12 細胞株 (親株) からのサブクローニングにより①TRTS 高感受性細胞株および②TRTS 非感受性細胞株の樹立を目的とする実験を行った。また、TRTS による

神経突起伸長誘導技術の向上のため、これら新規細胞株を活用しつつ、実用性や汎用性向上の観点から、TRTS により活性化されるシグナル経路等について

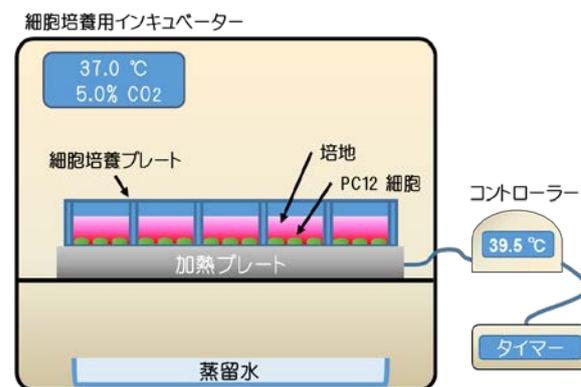


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

も検討を行った。研究打合わせは、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反復性温熱刺激 (すなわち TRTS) が神経細胞分化を誘導する分子細胞生物学的機序の解明と、TRTS による神経分化誘導効率の向上を図るための検討を実施した。

具体的には、PC12 親細胞株では、TRTS に対する感受性が明らかに異なる細胞が混在していることから、下記方法により、TRTS に対する感受性の異なるサブクローンの樹立を試みた。さらに新規サブクローン細胞株を活用し、細胞外部環境からの温熱作用が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及ぼす影響を検討し、主に以下の成果を得た。

[方法]

(1) TRTS を行うため従来通り加熱プレート (図 1) を使用した。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ラット由来 PC12 細胞株やそのサブクローンには、この加熱プレートを用い、TRTS 処理(9 時間×2、18 時間/日)が行われた(加熱時の培地温度：約 38.7°C)。その後、細胞形態、細

胞増殖および神経突起形成の程度を評価した。また骨形成タンパク質BMP4や神経成長因子NGF刺激による新規細胞株の神経突起形成率も評価した。

(2) TRTS 高感受性 PC12 細胞株および TRTS 非感受性 PC12 細胞株を PC12 親細胞株からそれぞれサブクローニングするために、96 穴プレートを用いた標準的な手法によりクローニングを実施した。まず細胞数を計測し、段階希釈を行った。その後 1 穴に 0.2~1 個入るように細胞を播種し、インキュベートした。次に顕微鏡下で細胞が 1 個だけいる穴を確認し、サブクローニングされた複数の細胞株をそれぞれ増殖させた。これらのサブクローン群を一部播種し直し、これらに一斉に TRTS (9 時間×2 回/日、7 日間) を負荷し、播種されたサブクローンの中から、TRTS に対する感受性の比較的高い細胞株と感受性のない細胞株をそれぞれ抽出・選択し、液体窒素タンクに保存した。

〔成果〕

(1) サブクローニングにより得られた TRTS 高感受性細胞株 (PC12-P1F1) および非感受性細胞株 (PC12-P1D10) の形態と細胞増殖率を評価したところ、通常の増殖培地環境下では、親細胞株と比較してそれぞれ有意な差はないことが分かった。

(2) TRTS を用いた神経細胞分化誘導実験において、神経突起伸長の程度により神経細胞分化率を評価したところ、PC12-P1F1 細胞は、親細胞株より TRTS による神経細胞分化率が有意に高いことが明らかとなった。一方、PC12-P1D10 細胞は、TRTS による神経細胞分化率が極めて低い性質を有することを確認した。

(3) TRTS の代わりに BMP4 を培地に添加し神経細胞分化を誘導したところ、TRTS により神経細胞分化を誘導した際と同じく、PC12-P1F1 細胞は親株と同様に BMP4 により神経突起を伸長させたが、TRTS に対して感受性の極めて低い PC12-P1D10 細胞は、TRTS を負荷した際と同様、神経突起を伸長させた細胞がほぼ存在せず、BMP4 に対しても低い感受性を呈することが明らかとなった。

(4) 最後に TRTS の代わりに NGF を培地に添加し神経細胞分化を誘導したところ、PC12-P1F1 細胞と PC12-P1D10 細胞はそれぞれ親株と同様、神経突起を伸長させることが明らかとなった。ただし、神経細胞分化率は、高い順に、PC12-P1F1 細胞株、PC12 親細胞株、PC12-P1D10 細胞株の順という結果となった。

以上 (1) ~ (3) により、PC12 細胞における TRTS 依存性神経細胞分化には、BMP により活性化されるシグナル経路が必要不可欠な役割を担う可能性が示唆された。また NGF 刺激では、BMP に

依存しないシグナル経路を活性化することで、PC12-P1D10 細胞の神経細胞分化がある程度誘導される可能性が示唆された。

(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異分野融合研究を強く促進する効果があ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解明は、TRTS をベースとする精密にプログラムされたマイルドな温度刺激を用いた、温熱療法の再生医学への将来的な応用を促進することが期待できるものと考えられる。

〔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.