

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：
洪 光 (東北大学大学院歯学研究科)
野口 拓哉 (東北大学院薬学研究科)
富並 香菜子 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 15 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。本研究では、PC12細胞のTRTSに対する応答性のバラツキの存在を理解するため、TRTS依存性神経細胞分化研究用モデル細胞株として、PC12親細胞株からのサブクローニングにより①TRTS高感受性細胞株(PC12-P1F1)および②TRTS非感受性細胞株(PC12-P1D10)を樹立した (*Int. J. Mol. Sci.*, Kudo

et al. 2020)。さらに、TRTSにより活性化されるシグナル経路等について例えば以下の点を明らかにした。

(1) 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

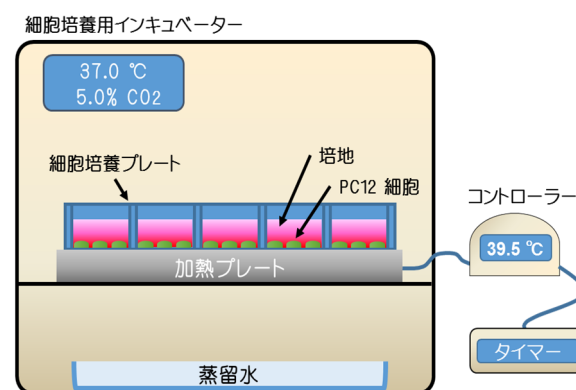


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

たところ、PC12-P1F1細胞は、親細胞よりTRTSによる神経細胞分化率が有意に高いことが示された。一方、PC12-P1D10細胞は、TRTSによる神経細胞分化率が極めて低いことを確認した。

(2) TRTSの代わりにBMP4を培地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様、PC12-P1F1細胞は親細胞と同じく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、神経突起が伸長せず、BMP4に対しても低い感受性を示した。このことは、TRTS依存性神経細胞分化に、BMPシグナル経路が重要である可能性を示す。

(3) TRTSではなくNGFを培地添加し神経細胞分化を誘導したところ、PC12-P1F1細胞とPC12-P1D10細胞はそれぞれ親細胞と同様、神経突起を伸長させた。神経細胞分化率は、高い順にPC12-P1F1、PC12(親株)、PC12-P1D10であった (*Int. J. Mol. Sci.*, Kudo et al. 2020)。

(4) 神経細胞分化過程にあるPC12-P1F1細胞から回収したトランスクリプトーム情報により、例えば、TRTSによる分化誘導開始後3日目において、69種類の遺伝子の発現が上昇し、30種類の遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。発現上昇する遺伝子には、BMPシグナルの下流遺伝子でかつBMPシグ

ナル経路の調節に関与する I-Smad 遺伝子等が含まれることから、TRTS が BMP シグナル経路の活性化を誘導することを介して神経細胞分化を促進する可能性が示された。

このような背景の下、本計画では、TRTS 研究をさらに推進するため、これらの新規樹立細胞株を用いて、TRTS 依存的な神経細胞分化誘導機構の解明と TRTS 技術の実用性向上の観点からさらなる検討を行った。研究打ち合わせは、研究期間中、合計 20 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（即ち TRTS）が神経細胞分化を誘導する分子的機序の解明と、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 細胞親株と新規樹立した PC12 細胞株 (PC12-P1F1 および PC12-P1D10) を用いて、細胞外部環境からの温熱作用が神経突起伸長過程に与える影響やそのシグナル経路に及ぼす影響を検討したところ、主に以下の成果を得た。

[方法]

(1) 上記の 3 つの細胞株を 10cm 培養ディッシュにてそれぞれ培養し、増殖後、分化誘導培地に播種した PC12-P1F1 細胞等には、従来通りの加熱プレート (図 1) を用いた神経細胞分化を誘導するため、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)。7 日後、神経突起形成の程度を評価した。この際、TRTS に関与するシグナル経路をより明らかにするため、各種シグナル阻害剤を作用させ、PC12 親株や新規細胞株の間における細胞応答の違いを検討した。

(2) 神経細胞分化誘導過程において細胞間情報伝達物質が培地中に放出されている可能性もあることから、TRTS 処理をした培地を回収し、それを別途培養した PC12-P1F1 細胞に作用させて、神経突起形成の程度を評価した。

[成果]

(1) PC12 親細胞株、並びにサブクローンの PC12-P1F1 および PC12-P1D10) のゲノムを比較解析したところ、BMP 受容体遺伝子 (*Bmpr1a*、*Bmpr1b* および *Bmpr2*) のそれぞれのエクソン領域においては、細胞株間で配列は同一であり、PC12-P1F1 や PC12-P1D10 に特有の一塩基変異等はないことが判明した。このことは、BMP4 に対する感受性の細胞株間の違いが少なくとも各 BMP 受容体遺伝子のエクソン領域における塩基配列の変異に由来するものではな

いことを示す。

(2) 神経細胞分化過程にある PC12-P1F1 細胞から回収したトランスクリプトーム情報により、例えば、TRTS による分化誘導開始後 3 日目において、69 種類の遺伝子の発現が上昇し、30 種類の遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。発現上昇する遺伝子には、BMP シグナルの下流遺伝子でかつ BMP シグナル経路の調節に関与する I-Smad 遺伝子等が含まれることから、TRTS が BMP シグナル経路の活性化を誘導することを介して神経細胞分化を促進する可能性が示された。

[4] 成果資料

(1) Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Hong G, Nakai J. Characterization of PC12 cell subclones with different sensitivities to programmed thermal stimulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. **21**(21): 8356. doi: 10.3390/ijms21218356.

(2) Kudo T, Tominami K, Hayashi Y, Noguchi T, Hong G. Establishment and characterization of neuron-like PC12-derived cell lines with hypersensitivity or hypersensitivity to temperature-regulated repeated thermal stimulation (TRTS). 第 97 回日本生理学会, 別府, 2020.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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.

(7) 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

(8) 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.