

課題番号 40

## 温度制御式反復性温熱刺激 (TRTS) による神経細胞および骨芽細胞の分化誘導メカニズムの検討

### [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 拓也 (東北大学大学院薬学研究科)

富並 香菜子 (東北大学大学院歯学研究科)

泉 哲 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 20 万円

### [2] 研究経過

#### (1) 研究目的

超高齢社会を既に迎えた日本では、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といえる。また、日本において、骨粗鬆症等の骨関連疾患も年々増え続け、40 歳以上の日本人のおよそ 1 割が骨粗鬆症であるとされ、その人数は 1000 万人を超える (Orimo et al. 2011)。しかし、予防や治療のために用いられる薬物療法においては重篤な副作用が認められる場合があり、副作用が少なくかつ非侵襲的な手法に基づく治療法・予防法の開発が望まれている。

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) が神経細胞や骨芽細胞の分化に与える影響については多くが不明であった。

申請者らはこれまでに、精密な加熱プレートで神経分化モデルのラット副腎髄質由来 PC12 細胞株やその派生株に適用し、TRTS を負荷することで神経細胞分化を誘導できることを明らかにした (Kudo et al. 2015, Luo et al. 2022)。また、申請者らは最近、上述の TRTS を骨芽細胞の分化モデルである前骨芽細胞様細胞、マウス MC3T3-E1 細胞株に作用

細胞培養用インキュベーター

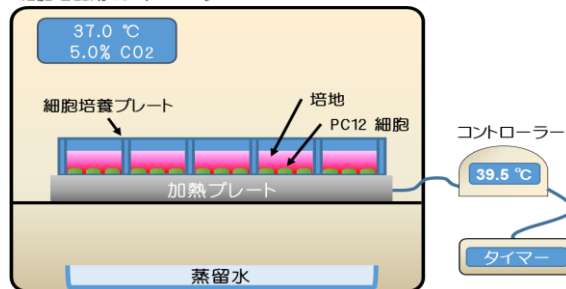


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

させ、TRTS が骨芽細胞分化を単独で促進することを、骨芽細胞分化マーカーを測定する実験 (ALP アッセイ) 等により証明した (第 99 回日本生理学会大会)。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。申請者らは TRTS 研究を強力に前進させるため、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 (PC12-P1F1) および②TRTS 非感受性細胞株 (PC12-P1D10) を樹立した (Kudo et al. 2020)。このような背景の下、本計画では、TRTS による神経突起伸長誘導技術や骨芽細胞分化誘導技術について、上述の PC12-P1F1、PC12-PD10 ならびに MC3T3-E1 等の細胞株を活用しつつ、TRTS 依存的な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。研究打合せは、研究期間中、毎月 (メール会議・オンライン会議を含む) 実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

これまで、PC12 細胞の TRTS 依存性神経細胞分化には、MAPK 経路に属する ERK1/2 経路等の活性化が必要なことを解明したが (Kudo et al. 2015, 5)、神経細胞分化に関与する各シグナル経路の、TRTS 依存性神経細胞分化における具体的な役割は依然不明な点が多い。これまでに申請者らは、JNK 経路を抑制する低分子化合物 SP600125 が、興味深いことに JNK 経路非依存的に TRTS による神経分化に促進的に寄与し、神経細胞分化率が向上することを解明した (第 99 回日本生理学会大会)。また、

TRTS 非感受性細胞株 (PC12-P1D10) は、親株と異なり、BMP 刺激でも神経細胞に分化しないことが半明した(Kudo et al. 2020)。そこで本共同研究では、表面温度の制御が可能な硝子製加熱プレートを用い、精密な温度制御下での反復性温熱刺激(即ち TRTS) が TRTS による神経分化誘導効率の向上と骨芽細胞分化を誘導する分子的機序の解明を図るためのさらなる検討を実施した。

具体的には PC12-P1F1 や MC3T3-E1 細胞等を用い、細胞外部からの温熱作用が PC12-P1F1 における神経突起伸長や MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に伴う骨芽細胞活性の上昇を引き起こすシグナル経路メカニズムをさらに検討し、主に以下の成果を得た。

#### [方法]

上記のそれぞれの細胞株を 10 cm 培養皿にて各々培養し、増殖後、分化誘導プレートに播種した細胞には、様々な条件下で加熱プレート(図 1)を用いた細胞分化を誘導するため、TRTS 処理(18 時間/日)が行われた(加温時培地温度:約 38.7°C)。7 日(骨芽細胞分化では最大 21 日後)、神経突起形成の程度や ALP 活性等の分化マーカーを評価した。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、シグナル阻害剤やリアルタイム PCR 法を活用し、細胞応答の違いを詳細に検討した。

#### [結果]

(1) これまでの解析により、JNK 経路を抑制する阻害剤 SP600125 が用量依存的かつ JNK 経路非依存的に TRTS による神経突起形成を促進することが示されたことを背景に、蛍光試薬を用いた生細胞蛍光染色法やリアルタイム PCR 法等を活用し、PC12-P1F1 細胞における TRTS 負荷に伴う神経突起の形態変化や遺伝子発現変動の評価を行った。

その結果、①蛍光染色による画像解析により TRTS 負荷により従来の計測方法による神経突起保有率(分化率)のみならず、分化誘導後の神経突起長の平均値自体も有意に上昇することが初めて示された。②神経細胞分化マーカー遺伝子の一つである  $\beta$ 3-Tubulin 遺伝子の遺伝子発現レベルの有意な上昇が明らかとなった。また、シグナル伝達分子としては、MAPK カスケードを構成する MKK3 や BMP シグナル経路を構成する抑制性 Smad の一つである Smad7 の遺伝子発現レベルの有意な亢進が明らかとなった。③しかし、SP600125 を TRTS と併用することにより Smad7 の遺伝子発現レベルは有意に抑制されることが示された。これらの結果から、SP600125 は Smad7 の発現レベル抑制を通じた BMP シグナル経路のネガティブフィードバックループの機能減弱を誘導することにより結果的に BMP シグナル経路を亢進させ神経細胞分化を促進

する可能性が示唆された。この点については、今後のさらなる詳細な機序の検討と解明が期待される。

(2) TRTS 負荷による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化機構の研究をさらに強力にかつ効率的に推進するため、TRTS に対する反応性の高い MC3T3-E1 細胞のサブクローンを樹立する必要があった。そこで申請者らは今年度、シングルコロニー法により MC3T3-E1 細胞の垂株を多数樹立した。今後、得られた垂株の中から、TRTS 高感受性 MC3T3-E1 細胞並びに低感受性 MC3T3-E1 細胞の同定を進める予定である。

#### (3-2) 波及効果や発展性など

本共同研究における成果は、再生医学・リハビリテーション関連領域の研究者間における融合領域研究を促進すると考えられる。また、PC12 細胞の神経細胞分化や MC3T3 細胞の骨芽細胞分化を調節する、TRTS 作用を支える分子的な基盤やその標的となる分子ならびにシグナル伝達経路に関する研究は非常に有意義で、TRTS に準じた非侵襲的なプログラム温熱刺激を用いた分化誘導療法や再生医学への今後の応用が期待される。

#### [4] 成果資料(一部抜粋)

(1) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Tanaka T, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Nakai J, Hong G, Wang H. SP600125 Enhances Temperature-Controlled Repeated Thermal Stimulation-Induced Neurite Outgrowth in PC12-P1F1 Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. 23(24):15602.

(2) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Nakai J, Hong G. SP600125 enhanced neurite outgrowth induced by temperature-controlled repeated thermal stimulation in PC12-P1F1 cells. 第 99 回日本生理学会大会. 仙台 (hybrid meeting), 2022.

(3) Tominami K, Kudo T, Hong G, Luo YR, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Nakai J. The effect of temperature-controlled repeated thermal stimulation on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. 第 99 回日本生理学会大会. 仙台 (hybrid meeting), 2022.

(4) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Nakai J, Hong G. Induction of neuronal differentiation in PC12-P1F1 cells by frequency-regulated micro-vibration. FJMU-HKU-TU international symposium on oral health science 2021. 仙台 (online meeting). 他.