

課題番号 17

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)

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で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。

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。

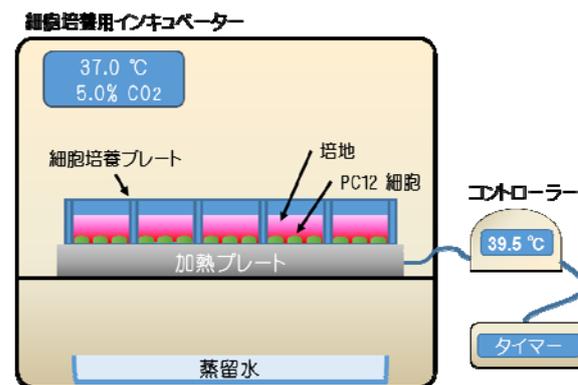


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

(1) TRTS 高感受性細胞 (PC12-P1F1) および非感受性細胞 (PC12-P1D10) の細胞形態を最大径で評価したところ、通常の増殖培地環境下では、親細胞と比較してそれぞれ有意な差はないことを示した。

(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。

(3) 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。

(4) 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。

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、全ゲノムシーケンズおよび mRNA シーケンズを実施し、TRTS 依存性神経細胞分化を制御

する分子機構を包括的に検討した。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、以下の方法で全ゲノムシーケンスと mRNA シーケンスを実施した。さらに得られた結果を解析し、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、ゲノムDNA回収キットを用いて無刺激の状態でゲノムDNAを回収した。その後、受託サービス活用によりそれぞれのゲノム情報を取得した。細胞株間の塩基配列の差について、様々な角度から検討を実施した。例えば新規樹立細胞株間では、BMP4に対する感受性の違いがあることから、各BMP受容体遺伝子について、新しく変異が生じてないか、ゲノムブラウザ等を活用し分析した。

(2) 増殖後、分化誘導培地に播種したPC12-P1F1細胞には、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（加温時の培地温度：約38.7℃）。今回は、分化効率を上げるため、JNK阻害剤も同時処理した。6日後、神経突起形成の程度を評価した。また、タイムポイント（day 0、day 3、day 6）を定め、PC12-P1F1細胞株のmRNAを回収キットにより回収した。その後、受託サービス活用により、各分化過程におけるトランスクリプトーム情報を取得した。

[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, 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) Kudo T, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Nunome S, Takagi T, Izumi S. Regulation of neurogenesis in PC12 cells by temperature-controlled repeated thermal stimulation. 第92回日本生理学会, 神戸, 2015.

(6) 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

(7) Kudo T, Kanetaka H, Shimizu Y, Abe T, Mori H, Mori K, Suzuki E, Takagi T, Izumi S. Induction of neurogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. *Cell Struct. Funct.* 2013. 38(1): 15-20.