

課題番号 57

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 拓哉 (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 15 万円

[2] 研究経過

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 と略す) が、神経細胞や骨芽細胞の分化に与える影響については、その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を神経分化モデルのラット副腎髄質由来 PC12 細胞株に

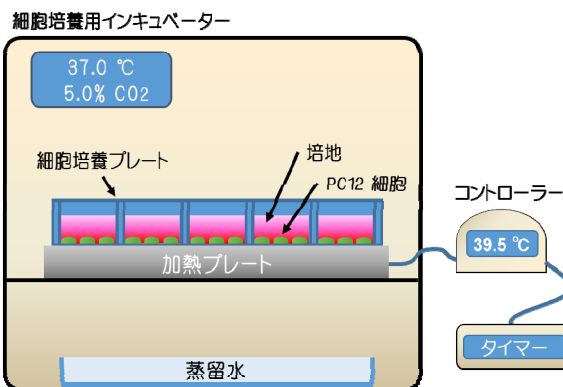


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

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)。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(アルカリホスファターゼアッセイ)等により解明した。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。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、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(未発表)。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判明した(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た、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、細胞外部環境からの温熱作用が PC12-P1F1 における神経突起伸長や MC3T3-E1 細胞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たところ、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(9時間×2、18時間/日)が行われた(加温時の標準的培地温度:約 38.7°C)。7日後、神経突起形成の程度や ALP 活性など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、各種シグナル阻害剤を作用させ、細胞応答の違いを詳細に検討した。

[結果]

(1) JNK 経路を抑制する阻害剤 SP600125 が用量依存的に TRTS による神経突起形成を促進することをはじめて明らかにした。また、SP600125 が 7日間の分化誘導期間の内、前半と後半いずれの期間においても分化促進作用を発揮することを確認した。しかし、興味深いことに、同じ JNK 経路を抑制する他のシグナル阻害剤(AS601245、TCSJNK5a 等)では同様の分化促進効果は認められなかった。このことから、本研究で観察した分化促進作用は SP600125 に特異的な現象であることが明らかとなった。それを裏付けるように、SP600125 のアナログでかつ JNK 活性の抑制作用を持たない SP600125-NC も SP600125 と同様の TRTS 依存性神経細胞分化誘導促進効果を発揮することが判明した。また、この SP600125 あるいは SP600125-NC による促進現象は BMP シグナル阻害剤

LDN193189 の同時処理により抑制されることが確認されたことから、BMP シグナル経路の関与が示唆された。SP600125 アナログの SP600125-NC が JNK シグナル経路を抑制することなしにいかにか TRTS 神経突起伸長の促進を誘導するのかについては、SP600125 や SP600125 が JNK 以外の何らかの分子標的を持つことが予想され、今後の解明が期待される。

(2) 様々な刺激条件を検討したところ、TRTS (培地温度:約 40 度、3~18 時間/日) が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に影響を与えないものの、アルカリホスファターゼ活性の亢進のみならず細胞外における石灰化を有意に誘導させること等が判明した。また BMP シグナル阻害剤 LDN193189 の作用により用量依存的にこの TRTS 単独処理による骨芽細胞分化が抑制されたことから、TRTS 依存性に誘導される骨芽細胞分化には BMP シグナル経路が必須の役割を果たす可能性が示唆された。今後さらにその機序を含む詳細について検討する予定である。

(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

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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)