

課題番号 33

温度制御式反復性温熱刺激 (TRTS) を用いた神経細胞および骨芽細胞分化における BMP シグナル調節機構の解析

〔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 13 万円

〔2〕研究経過

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、日本人のおよそ1割以上が骨粗鬆症であるとされ、その人数は1200万人を超える(厚生省・国民生活基礎調査, 2019)。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、細胞への一過性の熱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、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) 等により示した

(第 99 回日本生理学会大会, 2022, 第 45 回東北骨代謝・骨

粗鬆研究会 2024)。しかし TRTS による遺伝子初期応答や細胞内シグナル経路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 研究を強力に進めるため、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) 及び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 並びに MC3T3-E1 等の細胞株の内、今年度は特に MC3T3-E1 細胞を活用しつつ、BMP シグナル伝達経路に着目しつつ、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。

また、申請者らが PC12 細胞において既に行ったように、MC3T3-E1 細胞株 (親株) からのサブクローニングにより、TRTS 高感受性または低感受性の MC3T3-E1 細胞派生株を樹立し、TRTS 依存性骨芽細胞分化を解析するのにより有利な分化モデルの構築の準備も進めた。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、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)、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点が多い。申請者らは、JNK 活性阻害剤 SP600125 が、JNK 経路非依存的に TRTS による神経分化に

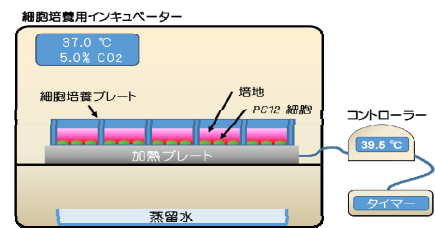


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

促進的に寄与し、神経細胞分化率が向上することを示した(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も示した(Kudo et al. 2020)。そこで本研究では、表面温度を制御可能な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(TRTS)による骨芽細胞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追加検討を行った。具体的にはMC3T3-E1細胞を用い、TRTSがMC3T3-E1の骨芽細胞活性上昇を惹起する細胞内シグナル伝達機構を主にリアルタイムPCR法を用いて検討し、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℃)。骨芽細胞分化では、初期応答遺伝子の動きを確認するため、7負荷開始後日後、コラーゲン1A遺伝子やその他のマーカー遺伝子の発現量の変動を評価した。この際、リアルタイムPCR法を活用し、遺伝子ごとのTRTSに対する応答を検討した。

[結果]

(1) TRTS依存性のALP遺伝子やSP7遺伝子発現量上昇やそれらのBMPシグナル阻害剤による有意な抑制のように、これまでの解析により、TRTS依存的骨芽細胞分化に関与する初期応答遺伝子が徐々に明らかとなってきた。こうした申請者らの実績を背景に、本研究では引き続きリアルタイムPCR法を活用し、MC3T3-E1細胞におけるTRTS負荷に伴う遺伝子の初期発現変動について、新たに追加検討を行った。

その結果、①コラーゲン1A遺伝子およびPhospho1遺伝子は、BMP2刺激とは異なり、TRTSの7日間負荷では有意に上昇しないことが示された。②Ibsp遺伝子は、BMP2刺激ではTRTSの7日間負荷では有意に上昇しないものの、TRTS刺激では有意に上昇することが示された。③BMP4遺伝子は、BMP2、TRTSいずれでも上昇しないことが明らかとなった。ただし、BMP4遺伝子は2週間のBMP2刺激で有意に上昇することを既に確認しているので、今後2週間のTRTS負荷をした場合、上述の骨芽細胞分化に関与する遺伝子がどのような変動を示すかさらに詳細に検討する必要がある。

(2) 申請者らの解析により、BMP2により骨芽細胞分化を誘導した際は、意外にも、細胞数は0日目よりも7日目の方が分化誘導環境下でも2倍以上増

加することが明らかとなった。このことから、今後、TRTS負荷によるMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化を誘導した際は、BMP2刺激の時と同様に細胞増殖速度が更新するの否かについて検討する必要がある。

(3) 一方、本研究をより効率的に推進するため、申請者らはTRTSに対する反応性の高いMC3T3-E1細胞のサブクローンの作成を進め、シングルコロニー法によりMC3T3-E1細胞の亜株を多数樹立した。今後、得られた亜株の細胞増殖速度が親株であるMC3T3-E1細胞に比べ極端に早い「または、極端に遅い細胞株を抽出してその後の解析から外してからその後の解析を進めていく必要がある、その手順については血球計算盤を活用した方法での最適な実施条件を検討した。

(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) 松下歩夢, 工藤忠明, 富並香菜子, 林陽平, 泉哲, 田中太邦, 安藤恵子, 野口拓也, 松沢厚, 洪光ら. 周波数制御式反復微細振動(FRMV)はBMPシグナル経路を介してMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化を促進する. 第46回東北骨代謝・骨粗鬆研究会. 仙台, 2025.

(以上)