

課題番号 28

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：家村 顕自

(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 等の細胞株を活用

しつつ、また、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。

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

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を用い、精密な温度制御下での反

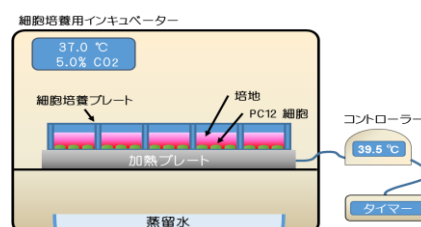


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

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検討し、主に以下の成果を得た。

また今年度は過去に実施していた TRTS に対する高感受性 PC12 サブクローンである PC12-P1F1 細胞のゲノム解析を再開し、PC12-P1F1 に特異的な変異がどのような細胞内シグナル経路に影響を与えているのかについても追加解析を実施した。

[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 (12 時間/日) が行われた (加温時培地温度: 約 38.7°C)。TRTS 依存性の骨芽細胞分化における BMP シグナル経路の役割の重要性を確認するため、TRTS と BMP 処理を同時に実施した。また、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 を TRTS 処理する際に同時に作用させ、TRTS 依存性の骨芽細胞分化に対する影響を評価した。骨芽細胞分化の程度を評価するため、ALP アッセイを用い定量的評価を実施した。PC12-P1F1 細胞に特異的な遺伝子変異に関するゲノム解析については、これまでに取得した膨大な配列データからプログラムによるフィルリングを実施したうえで、当該サブクローンに特異的な遺伝子変異が主にどのような細胞内シグナル経路に影響を与えるかデータベース上で解析した。

[結果]

(1) TRTS 依存性の ALP 活性の上昇がこれまで通り再現された。また、ポジティブコントロールとしても用いた BMP 依存性の ALP 活性の上昇は、TRTS の同時処理によりさらに促進されることが確認された。また、BMP シグナル阻害剤 LDN193189 は、BMP 依存性の ALP 酵素活性の抑制のみならず、TRTS 依存性の ALP 酵素活性をも完全に抑制することが確認され、TRTS 依存性骨芽細胞分化においても BMP シグナル経路が何らかの必須の役割を担うことが初めて示唆された。

(2) 申請者らのゲノム解析により、TRTS 高感受性サブクローンである PC12-P1F1 細胞において、親株と比較して、特に cAMP シグナル経路および BMP シグナル経路に変異が蓄積していることが明らかとなった。今後、適切なシグナル阻害等を用いて、これらの経路が TRTS 依存性神経細胞分化にどのように関与しているかを明らかにする予定である。

(2) 一方、本研究をより効率的に推進するため、申請者らはこれまでに 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。次年度以降、得られた亜株の TRTS 処理後 (1 週間後) の解析を進めていく予定である。

(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) 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.

(2) Matsushita A, Kudo T, Tominami K, Hayashi Y, Noguchi T, Tanaka T, Izumi S, Gengyo-Ando K, Matsuzawa A, Hong G, Nakai J. Frequency-Regulated Repeated Micro-Vibration Promotes Osteoblast Differentiation Through BMP Signaling in MC3T3-E1 Cells. *Life.*, 2025. 15(4) 588-588.

(3) Kokubun T, Kudo T, Tominami K, Ishigaki H, Matsushita A, Izumi S, Tanaka T, Kawaguchi K, Hayashi Y, Sato S, et al. Effects of the Uncoupling Protein 1 (UCP1) A-3826G Polymorphism on Taste Preferences in Healthy Young Japanese Adults. *Life.*, 16(3) 499-499.

(以上)