

課題番号 38

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

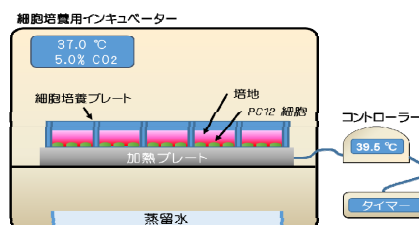


図 1. 本研究における温熱刺激法の模式図

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、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追加検討を行った。具体的には PC12-P1F1 や MC3T3-E1 細胞等を用い、TRTS が PC12-P1F1 の神経突起伸長や MC3T3-E1 の骨芽細胞活性上昇

を惹起する機構を検討し、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日後(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を示した。②神経細胞分化マーカー遺伝子の一つ、 β 3-Tubulin遺伝子の発現レベルの有意な上昇が示された。また、シグナル分子としては、MAPKカスケードを構成するMKK3やBMP経路を構成する抑制性Smad(Smad7)の遺伝子発現レベルの有意な亢進が示された。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(Luo et al. 2022)。この点については、今後さらなる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では、ALPの酵素活性の上昇等をこれまでに認めていたが、今回、骨芽細胞分化マーカー遺伝子であるALP遺伝子やSp7遺伝子の発現レベルもTRTSにより有意に上昇することが明らかとなった。さらにTRTSによるこれら遺伝子発現レベルの上昇はBMPシグナル阻害剤により顕著に抑制された。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) 富並香菜子, 工藤忠明, 林陽平, 泉哲, 松下歩夢, 羅悠然, 田中太邦, 安藤恵子, 野口拓也, 松沢厚ら. 骨粗鬆学会温度制御式反復温熱刺激を用いた骨芽細胞分化誘導法の開発. 第45回東北骨代謝・骨粗鬆研究会. 仙台, 2024.

(2) Tominami K., Kudo T, Noguchi T, Hayashi Y, Luo YR, Tanaka T, Matsushita A, Izumi S, et al. Physical Stimulation Methods Developed for In Vitro Neuronal Differentiation Studies of PC12 Cells: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024. 25(2) 772-772.

(3) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Tanaka T, Hayashi Y, Noguchi T, et al. SP600125 Enhances Temperature-Controlled Repeated Thermal Stimulation-Induced Neurite Outgrowth in PC12-P1F1 Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. 23(24):15602.

(4) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, et al. 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.

(5) 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.

(6) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, et al. 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. 他.