

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861880

研究課題名(和文)パルス磁場刺激による神経突起伸長誘導メカニズムおよび配向制御法の解析

研究課題名(英文)The analysis of the mechanism of neuritogenesis by pulsed electromagnetic field and the control method of the elongating neurite direction

研究代表者

工藤 忠明(Tada-aki, Kudo)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50431606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々は、神経分化モデルPC12細胞に対し、励磁コイルによりパルス磁場刺激(PEMF)依存的神経突起伸長を誘導させる方法を見出したが、その機序は未解明であった。そこで本研究では、PEMFによる神経突起伸長誘導機序、コイルによる温熱作用の神経突起伸長への影響、更には、神経突起配向制御の可能性を検討することを目的に解析を行った。その結果、PEMF依存性神経細胞分化にはBMP経路が関与すること、PEMFによる神経細分化誘導にはコイル由来ジュール熱による温熱作用も一部関与すること、条件改良により温熱刺激単独でも分化誘導が可能なこと、一方向性平行磁場では神経突起の配向制御は困難であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we developed a novel method for inducing neuritogenesis (NG) using a pulsed electromagnetic field (PEMF) with an exciting coil in rat-derived PC12 cells, which are a model of neuronal differentiation. However, the mechanism that enhances NG is still unknown. In the present study, we examined the mechanism of NG due to PEMF, the effect of Joule heating on NG, and the possibility of PEMF affecting the direction of NG. We demonstrated that the bone morphogenetic protein (BMP) pathway is essential in the process of PEMF-induced NG and that the Joule heat generated by the coil partially contributes to the PEMF-mediated induction of neuronal differentiation. We also found that it is possible to efficiently differentiate the cells into neuronal cells by thermal stimulation alone and that it is difficult to regulate the direction of NG using a mono-directional and parallel magnetic field with a custom-made exciting coil as used in the present study.

研究分野：生理学、分子生物学、再生医歯学

キーワード：パルス磁場刺激 PC12細胞 神経細胞分化

1. 研究開始当初の背景

学習や記憶等の複雑な脳機能を可能にするのは、神経細胞が神経突起(樹状突起と軸索)を伸ばし、互いに接触することにより形成される複雑な神経回路の存在である。この特異な細胞形態が、神経回路の形成による高次脳機能発現の重要な基盤である。

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による四肢麻痺に苦しむ患者数は200万人にも及ぶ。摂食・嚥下障害をはじめ、脳や脊髄損傷後の機能回復治療への需要は益々大きくなるばかりであり、医工連携による最新の医工学技術を応用した新しいリハビリテーションシステムの開発が望まれている。近年、脳や神経が可塑性変化を示すことが報告され、中でも、パルス磁場により脳を刺激する経頭蓋磁場刺激(TMS)は、殊に脳卒中片麻痺等の治療手段として有望視されている(Izumi et al. 2008)。パルス磁場は以下の独特の利点を持つ。(1)非接触で対象を刺激可能である。(2)同程度の刺激を行った場合、他方法より疼痛がはるかに少ない。

一方で、パルス磁場による神経回路再編成のメカニズムには不明点が多い。また、磁場は、過去の培養細胞実験により、細胞内cAMP濃度、Caイオン濃度、遺伝子発現および神経突起の伸長や配向性に影響を与える(Blackman et al. 1995; Trilio et al. 1996; Blackman et al. 1998; Mary et al. 1998; Elizabeth et al. 2000; Sontag et al. 2006; Kim et al. 2008; Wang et al. 2010)との報告があるが、磁場刺激の質や条件により結果は全く異なり、作用機序はなお全容不明といえる。

上記背景の下、我々は最近、パルス磁場刺激装置を様々な条件でラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞株に対し適用することで、励磁コイルを用いたパルス磁場刺激によりMEK-ERK1/2シグナル経路の活性化を伴う神経突起伸長を誘導する条件を見出した(Kudo et al. 2013)。神経細胞分化研究において、PC12細胞はよく研究されたモデル系であり、NGFが細胞膜受容体TrkAに結合すると、Ras依存性にMEK-ERK1/2経路などが活性化され神経突起が伸長する。しかし最近の我々の研究成果(Kudo et al. 2013)によると、パルス磁場刺激依存性神経突起伸長はMEK阻害剤U0126等で抑制できるが、TrkA阻害剤では抑制できない等、パルス磁場による細胞内シグナル伝達経路活性化機構は依然不明点が多かった。

2. 研究の目的

上記背景の下、励磁コイルを用いたパルス磁場刺激装置によるパルス磁場を、PC12細胞に作用させ、パルス磁場による神経突起伸長の分子機構や神経突起の配向調節法について、損傷を受けた神経回路のバイパス形成促進の観点から、とくに、パルス磁場依存性

神経突起伸長の基本メカニズム、および一方向性の平行パルス磁場刺激が神経突起の配向に与える影響に着目し、基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)パルス磁場依存性神経突起伸長の基本メカニズムの解析：以下の方法で下記項目を検討することにより、これまでに我々が確立した励磁コイルを用いたパルス磁場刺激によるPC12細胞神経突起伸長誘導法について、その分子的メカニズムを解析した。

方法：37℃CO₂インキュベーター内に磁場刺激装置に接続した励磁コイルをセットし、その上にPC12細胞が播種された培養用プレートにセットした。その後、細胞に次の条件で刺激を負荷した。パルス磁場刺激の負荷条件：最大磁束密度：0.7T、周波数0.172Hz、波形：単相性・単パルス、曝露時間：12時間/日(3時間×4回)、分化誘導期間：6~7日間。

また、励磁コイル由来の温熱作用により神経突起伸長が何らかの影響を受ける可能性についても検討した。励磁コイル由来の温熱作用を再現する目的では、精密な温度制御が可能な加熱プレートを用い、これに培養プレートにセットし検討した。検討項目：

- ・パルス磁場刺激によるMEK-ERK1/2経路の活性化機構の検討。
- ・パルス磁場による神経突起伸長に関する他のシグナル経路の検討。

(2)一方向性の平行パルス磁場刺激が神経突起の配向に与える影響の解析：永久磁石(ネオジウム磁石)から生じる静磁場では、神経突起伸長は誘導できないが、NGFによる神経突起伸長の方向に影響を与えるとされる(Kim et al. 2008)。そこで我々は、動磁場であるパルス磁場が、PC12細胞の神経突起の伸長のみならず、配向についても制御できるか否かについて以下の方法にて検討した。

方法：パルス磁場の磁束方向を、培養プレート上の全細胞に一方向性かつ平行に作用させるべく開発した細胞刺激用励磁空芯コイルを用意した。分化誘導後の位相差顕微鏡画像と画像解析ソフトにより、個々の分化細胞において、パルス磁場の磁束方向と最も伸長した神経突起の方向とがなす角度を計測し、神経突起の配向を統計的に定量解析した。

4. 研究成果

(1)パルス磁場刺激による細胞内シグナル経路の活性化機構

これまでに、培養用プレートにセットした励磁コイルによるパルス磁場刺激(中心磁束密度700mT、12時間/日)が、MEK-ERK1/2経路を活性化させ、神経分化モデルのラット由来PC12細胞の神経細胞分化を誘導することを示したが、励磁コイルを用いたパルス磁場に

よる細胞内シグナル伝達機構は不明点が多かった。そこで本研究では、パルス磁場刺激を PC12 細胞に作用させ、パルス磁場刺激による細胞内シグナル経路の活性化機構について検討した。このために、MAP3K ファミリーや TRP チャネル等、様々なシグナル伝達因子の阻害剤を神経分化誘導時に作用させて、パルス磁場刺激依存的神経細胞分化誘導に關与する新たなシグナル分子およびシグナル伝達経路を探索した。その結果、TRPV3 や TRPV4 等の温度刺激に反応する各種 TRP チャネルの阻害剤や Rap-1 等の MAP4K の阻害剤を用いた場合は、パルス磁場刺激依存性神経細胞分化は著名には抑制できなかった。一方、骨形成タンパク質(BMP)の競合的阻害剤である Noggin や I 型 BMP 受容体の低分子阻害剤 LDN-193189 などを用いると、パルス磁場依存性の神経細胞分化は著しく抑制されたことから、BMP シグナル経路が何らかの様式によりパルス磁場依存性神経細胞分化過程において必須の役割を担っていることが明らかとなった(投稿準備中)。

(2) パルス刺激時に発生する励磁コイル由来の温熱作用による神経突起伸長への影響

励磁コイル由来の温熱作用により神経突起伸長が何らかの影響を受ける可能性が考えられたことから、以下の3つの検討を行った。まず、培養プレート内の培地温度と励磁コイルの表面温度との関係性を評価した。次に加熱プレートにて励磁コイルによる温熱作用を再現し、神経突起伸長に与える影響を検討した。さらに加熱プレートによる細胞刺激条件を改良することにより神経分化誘導効率を改善できないか検討した。

その結果、上記については、励磁コイル操作時のコイル表面温度上昇による培地温度上昇は、最大約 1 °C であった。この培地温度上昇は加熱プレートによりほぼ再現することができた。については、加熱プレートにて再現した温度刺激単独でも、神経突起伸長が誘導された。しかし温熱依存性神経突起形成率は、励磁コイルによるそれと比べて有意に低かった。このことは、精密な温熱刺激が神経突起伸長を誘導できることと、励磁コイルを用いた場合、コイルにより発生したパルス磁場に加え、同時に発生するジュール熱も PC12 細胞における神経突起形成の誘導に協調的に貢献することを示唆している。については、加熱プレートによる刺激方法を 1 日延べ 12 時間から 18 時間に温熱刺激負荷を増加させることにより、神経細胞分化効率を向上させることに成功した。また、温熱刺激依存性神経細胞分化は、ERK 経路や p38 経路の阻害剤を前処理することにより有意に抑制されたことから、これらの経路が温熱刺激依存性の神経細胞分化において必須の役割を担っていることも示唆された(Kudo et al. 2015)。

(3) 一方向性の平行パルス磁場刺激が神経突起の配向に与える影響

動磁場であるパルス磁場が、PC12 細胞の神経突起伸長における配向制御に關与する可能性については、細胞に対して磁束方向が一方向性でかつ平行性を有するパルス磁場を負荷することが可能な、特殊な励磁コイルを用意し検討した。PC12 細胞に様々な条件でこれを負荷することにより、BMP または NGF 依存性神経細胞分化誘導時の神経突起伸長方向への影響の有無を、細胞形態の顕微鏡位相差像により統計的に解析した。その結果、関連文献も参考に多数の実験パラメータを用いて実施したものの、我々が用意した装置を用いた一方向性平行磁場の負荷のみでは、BMP ないし NGF 依存性神経突起伸長の配向制御は困難であることが示唆された。ゆえに磁場による配向制御を可能にするためには、今後のさらなる実験条件の検討や装置の改善が必須であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kudo TA, 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, 査読有、10 巻、2015 年、e0124024、doi: 10.1371/journal.pone.0124024.

[学会発表](計6件)

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 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18 日~2015 年 11 月 20 日、福岡国際会議場(福岡)

工藤忠明、金高弘恭、温度制御式反復温熱刺激は PC12 細胞の神経細胞分化を誘導する、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015 年 9 月 11 日~2015 年 9 月 23 日、新潟コンベンションセンター(新潟)

Kudo TA, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Abe T, Mori H, Mori K, Abe G, Kosukegawa H, Takagi T, Izumi S, Regulation of neuritogenesis in PC12 cells by temperature-controlled repeated thermal stimulation, 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日~2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場(神戸)

Kudo TA, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Abe T, Mori H, Mori K, Abe G, Kosukegawa H, Takagi T, Izumi S, Kikuchi M, Stimulation of neuritogenesis in PC12 cells by a

pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling、The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science、2014年1月20日～2014年1月21日、片平さくらホール（仙台）

Kudo TA, Kanetaka H, Mochizuki K, Tominami K, Abe T, Mori H, Mori K, Abe G, Kosukegawa H, 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、2014年1月20日～2014年1月21日、片平さくらホール（仙台）

工藤忠明、金高弘恭、布目祥子、高木敏行、出江紳一、連続磁気パルスによる神経細胞分化調節機構の解析、第72回日本矯正歯科学会大会、2013年10月7日～2013年10月9日、キッセイ文化ホール（松本）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 忠明 (TADA-AKI KUDO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50431606

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：