

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：35308

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560294

研究課題名(和文)変異PI3K細胞のAkt活性度を指標とした電気刺激治療の老化組織保護効果の解析

研究課題名(英文)Analysis of protective effects on aged tissues in electrical stimulation therapy with Akt activity of mutant PI3K cells as an indicator

研究代表者

河村 顕治 (Kawamura, Kenji)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：40278974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：PC12細胞から変異源処理によって細胞内シグナル伝達系に突然変異をもった特殊な神経細胞であるPC12m3細胞を開発した。PC12m3細胞は薬剤や様々な物理刺激に鋭敏に反応するので、抵抗性を示す細胞を見つけPC12m321細胞と命名した。PC12m321細胞はPI3Kに突然変異をもっていた。PI3Kは主としてインスリンによって活性化し、Aktを介してサバイバルの上昇や長寿遺伝子の活性化に働いている。PC12m3細胞に100 mAの電気刺激を30分与えたところ、増殖因子によるAkt活性を大きく抑制した。これは、電気刺激がAkt活性の抑制を介して長寿遺伝子FOXOの活性化に働くことを示している。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel PC12 mutant cell line (PC12m3) that shows poor neurite outgrowth in spite of normal sustained activation of MAPK by growth factor treatment. When we investigated Akt activity in response to growth factors such as NGF and EGF in PC12m3 cells, we discovered cells, PC12m321 cells, that responded to insulin but not respond to NGF and EGF. A point mutation was found in PI3K of PC12m321 cells. PC12m321 cells and a PI3K mutant gene recombinant clone from PC12m3 cells exhibit increases in survival as a result of cytotoxic shock. In the presence of growth factors, PC12m3 cells were given 100 mA of electrical stimulation for 30 minutes, and the Akt activity was greatly suppressed. This indicates that electrical stimulation acts on activation of the Longevity gene FOXO via suppression of Akt activity.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：サルコペニア PI3K Akt 電気刺激 骨格筋 高ストレス耐性 長寿命化 健康寿命

1. 研究開始当初の背景

加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)は高齢者の転倒・寝たきりの原因として、その予防は喫緊の課題である。サルコペニアでは筋衛星細胞数減少による修復・再生能低下により筋量が減少するだけでなく、運動神経が減少して他の運動単位の発芽(sprouting)により支配比が増加(Roos et al, 1997)することで運動単位が減少し、typeII 線維の選択的脱神経と周囲の typeI 線維からの再支配などが見られる。さらに神経筋接合不全、毛細血管血流不全などが起こるとされている。すなわちサルコペニアの改善には筋組織だけでなく神経細胞やそれらを栄養する血管細胞も含めた神経筋単位のトータルな再生が必要である。一方、極めて微弱な電流の長期作用として、骨の発育や損傷治癒の促進作用などの、元来の生理機能に対する補助的効果が知られている。その臨床的有用性は経験的に認知されていたにも関わらず、その生体の受容・作用メカニズムについては全く不明であった。最近になって微弱電流には PI3K-Akt 経路の活性増強効果が認められ、微弱電流の損傷修復過程に PI3K の活性化が関わっている可能性を示す報告がなされた(Nature, 2006)。すなわち、電気刺激は、PI3K-Akt を介した抗アポトーシス効果を有している。

2. 研究の目的

サルコペニアの改善には筋組織だけでなく神経細胞やそれらを栄養する血管細胞も含めた神経筋単位のトータルな再生が必要である。我々はこれまでの PC12 細胞を用いた研究の中から細胞のストレス耐性を高め、寿命延長に作用する遺伝子改変技術を発見した。それは、PI3K の p85 調節サブユニット (p85) 遺伝子に対してただ 1 個の特定の塩基に変異を導入することによりインスリン系以外の増殖因子によって Akt を活性化しない変異 PI3K を発現する変異細胞を作出する方法である。既にこの遺伝子をマウスに導入し、飼料を自由摂取させてコントロールに比して 25%以上の寿命延長効果を確認している。しかし人に対する遺伝子導入は不可能なので、既に電気刺激が PI3K-Akt を介した抗アポトーシス効果を有していることが確認されている。そこで我々が開発した変異 PI3K をベンチマークとして、同様の作用が得られる電気刺激条件および化合物を探索し、電気治療として全身の骨格筋の高ストレス耐性長寿命化を計りサルコペニアの予防法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

我々が開発した変異 PI3K を発現する改変 PC12 細胞(PC12m321 細胞)では増殖因子があっても PI3K の活性化は起こらず、細胞障害作用条件を与えた時のみ PI3K-Akt が活性化して生存率が上昇する。増殖因子存在下で Akt 活性を抑制する電気刺激条件はストレス

が負荷された時、非受容体型チロシンキナーゼを活性化して PI3K-Akt の活性化が起こり細胞の生存率を高めると考えられる。細胞障害作用物投与などのストレス下で PC12m3 細胞(親細胞)に改変 PC12 細胞(PC12m321 細胞)と同程度の生存率を示す電気刺激条件および化合物を選抜することにより、健康寿命を延伸するのに最適な電気治療を探索する。

実験に使用した PC12 細胞は、グリーンラによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である。この細胞は、米国 Rockville, ME の American type culture collection より購入した。

細胞は、10%ウマ血清と 5%牛胎児血清それに 80 µg/ml のカナマイシンを含む高グルコース型 DME 培地を用いて継代し維持した。細胞の培養は、CO₂ 培養器を用い、5% CO₂ で 37 °C で行ない、培地交換は 3 日おきに行なった。継代は、細胞が培養シャーレ一杯になるとピペティングし、1:10 に希釈して新しいシャーレに蒔きなおすという方法により行なった。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 方法で調べ、感染のないことを確認して実験を行なった。

(1) 活性酸素による細胞生存率の測定

PC12 m3 細胞(親細胞)と PC12m321 細胞に H₂O₂ を 0.05~0.2 mM で 2 時間、あるいは 1~20 mM で 10 分間作用させる。H₂O₂ を施した細胞は遠心分離機を用いて H₂O₂ が完全になくなるまで洗浄後フラスコにまいて 1~2 週間培養しコロニーを形成させた。コロニー数は位相差顕微鏡下で計測し H₂O₂ による細胞生存率を検出した。

(2) Akt 活性の検出

活性化した Akt キナーゼの検出は免疫プロット方によって行った。方法は、PC12m3 および PC12m321 の細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で H₂O₂ を 0.1 mM で 2 時間、あるいは 10 mM で 10 分間作用させ、対照としてインスリン(100ng/ml)処理を 30 分間行い酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニルメンブレンにプロットした。プロットした蛋白質はホスホ Akt 抗体を作用させてリン酸化した Akt の検出を行った。

(3) 電気刺激による Akt の活性化

培養細胞への電気刺激のために細胞電気刺激装置を使用した(図 1)。PC12m3 細胞に Nicolet Viking IV 筋電計(Nicolet Biomedical Inc., USA)を用いて電気刺激を行った。電気刺激の条件はこれまでの研究で PC12m3 細胞において最も神経突起形成が見られた 100mA で 30 分の通電を行った。電気刺激は SEP の設定で 1ms の duration の矩形波を 10Hz で負荷した。その後、電気刺激を施した細胞において Akt の活性化を調べた。

(4) ストレス耐性、細胞長寿化に働く変異 PI3K と同様の働きをする物質の探索

PC12m3 細胞に添加して増殖因子存在下で

Akt 活性を抑制する物質を探索した。



図 1 . 細胞電気刺激装置

4 . 研究成果

(1)活性酸素による細胞生存率

PI3K 遺伝子に異常をもつ PC12m321 細胞と PI3K 遺伝子が正常な親細胞における H_2O_2 による生存率をコロニー形成法によって検出したところ H_2O_2 を低濃度で長時間作用させると、PC12m321 細胞において PC12 親細胞の約 2 倍の活性酸素抵抗性が観察された。一方、 H_2O_2 を高濃度で短時間作用させると、PC12m321 細胞において PC12 親細胞の 30 倍以上の活性酸素抵抗性が観察された。

(2)活性酸素による Akt の活性化

PC12m3 および PC12m321 の細胞に H_2O_2 を 0.1 mM で 2 時間、あるいは 10 mM で 10 分間作用させて Akt の活性化を調べたところ、PC12m3 細胞と PC12m321 細胞のどちらも H_2O_2 を 10 mM で 10 分間作用させたものに高い Akt の活性化が認められた。一方、PC12m321 細胞はインスリン系以外の増殖因子によって Akt を活性化しないことが判明している。Akt は PI3K によって活性化するシグナル伝達タンパク質であるので、PC12m321 細胞は PI3K に突然変異があるが活性酸素による Akt 活性は正常に起こることが判明した。

(3)電気刺激による Akt の活性化

PC12m3 細胞に 100 mA の電気を 30 分与えたところ、電気刺激が増殖因子による Akt 活性を大きく抑制した。

(4) ストレス耐性、細胞長寿化に働く変異 PI3K と同様の働きをする物質の探索

変異 PI3K と同様の働きをする物質をキノコから発見した。

ホスホイノシチド - 3 キナーゼ (PI3K) は増殖因子やサイトカイン等細胞障害作用物によって活性化したチロシンキナーゼによって細胞膜上にリクルートされ Akt を介して主としてサバイバル (アポトーシスの回避) に働き、増殖や分化にも関与する。チロシンキナーゼは、EGF や PDGF などの増殖因子によって活性化する受容体型チロシンキナーゼとサイトカイン等細胞障害作用物によって活性化する非受容体型チロシンキナーゼの 2 種類がある。PI3K は多くの種類があるが、主として p110 と p85 がダイマーを作って働

いており、p110 は触媒サブユニットであり p85 は SH2 ドメインをもつ調節サブユニットで活性型チロシンキナーゼに会合させる働きをもつ。P85 には p85 と p85^Δ があり、今回我々は PC12 細胞において、受容体チロシンキナーゼには p85 が優先的に会合しており、PI3K の突然変異体は p85^Δ のチロシンキナーゼへの会合に異常が生じインスリン系以外の増殖因子によって PI3K-Akt 活性が起こらないことを発見した。しかし、この突然変異細胞の p85^Δ は正常であり我々は、非受容体型チロシンキナーゼが活性酸素によって活性化した時、新たな PI3K-Akt の活性化が起こり高いサバイバルの上昇を示すことを見いだした。活性酸素は、身体の正常な代謝における産物であり、ヒトの老化における最も大きな原因になっている。スーパーオキシドデスムターゼやカタラーゼそれにグルタチオンは活性酸素の毒性を中和して老化を遅らせる働きをしている。

今回の研究によって我々は、PI3K 遺伝子に異常をもつ PC12m321 細胞は活性酸素に対して 30 倍以上の抵抗性を与えることを見いだした。このことは、PI3K 変異遺伝子によって作られた異常たんぱく質が働くと活性酸素抵抗性になることを意味する。

また PI3K が正常な細胞に PI3K 突然変異遺伝子 (PI3K の特定の塩基が 1 個だけ変異している) を組み込むと、増殖因子があっても PI3K の活性化は起こらず、細胞障害作用物を与えた時のみ PI3K-Akt が活性化してサバイバルが上昇した。この特殊な培養細胞は顕著なストレス耐性を示す。変異した PI3K は、活性酸素などの細胞障害物のない時は増殖因子による Akt 活性を不活性化させることで、寿命の延伸に関与している FOXO タンパク質を活性化させて寿命の延伸に働いている。FOXO は細胞内の異常タンパク質の毒性を弱める作用もあり、それも細胞の寿命を延伸させている。

今回の研究では PC12m3 細胞に 100 mA の電気を 30 分与えたところ、電気刺激が増殖因子による Akt 活性を大きく抑制した。これは、電気刺激が Akt 活性の抑制を介して長寿遺伝子 FOXO の活性化に働くことを示している。さらに老化の最大の原因とされる活性酸素による傷害に対して、変異 PI3K 遺伝子は 30 倍もの抵抗力を与えることが判明した。これらの成果から、加齢性筋肉減弱症 (サルコペニア) は、電気刺激によって十分に予防できると考えられる。

本研究の目的は高齢者の転倒や寝たきりの原因となっているサルコペニアの予防と改善に、我々が開発した長寿遺伝子である変異 PI3K の働きをベンチマークとした電気刺激治療器活用法を確立することである。サルコペニアを電気刺激治療によってストレス耐性、細胞長寿化を計りサルコペニアの予防法を確立するため、ストレス耐性、細胞長寿化に働く変異 PI3K と同様の働きをする物質

の探索を行い、変異 PI3K と同様の働きをする化合物をキノコから発見した。電気刺激を 30 分与えることで長寿遺伝子の FOXO を活性化し、変異 PI3K と同様の作用をもつキノコ等の摂取が活性酸素による筋肉の老化を予防する可能性があることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

井上 茂樹、平上 二九三、河村 顕治、元田 弘敏、加納 良男、PC12 細胞の分化と増殖における電磁波照射の効果、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、2016、17 号、2016、21-23

秋山 純一、平上 二九三、野中 紘士、川浦 昭彦、元田 弘敏、井上 茂樹、河村 顕治、加納 良男、健康長寿と細胞の寿命、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、17 号、2016、11-14

加納 良男、平上 二九三、川浦 昭彦、元田 弘敏、小池 好久、秋山 純一、井上 茂樹、河村 顕治、細胞内シグナル伝達変異細胞を用いた抗がん物質の探索、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、17 号、2016、1-6

加納 良男、平上 二九三、川浦 昭彦、元田 弘敏、小池 好久、秋山 純一、井上 茂樹、河村 顕治、Akt 酵素活性に変異を誘導したヒト正常繊維芽細胞の解析、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、16 号、2015、17-20

井上 茂樹、平上 二九三、元田 弘敏、河村 顕治、加納 良男、培養細胞における温熱刺激と電磁波刺激の効果の検討、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、15 号、2014、29-32

Yoshihisa Koike、Yoko Yamanishi、Yoshio Kano、Effects of Nonpharmacological Therapies for Diseases of the Elderly、Psychology Research、査読有、4(5)、2014、389-396

〔学会発表〕(計 1 件)

井上茂樹、平上二九三、元田弘敏、河村 顕治、加納良男、培養細胞における温熱刺激と電磁波刺激の効果の相違についての検討、OUS フォーラム 2014、2014 年 11 月 21 日、岡山プラザホテル

〔その他〕

ホームページ等

河村顕治研究室

<http://kawamura-md.jimdo.com>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河村 顕治 (KAWAMURA KENJI)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：40278974

(2)研究分担者

加納 良男 (KANO YOSHIO)

吉備国際大学・保健福祉研究所・教授

研究者番号：70116200