

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11643

研究課題名(和文) 温度制御式反復温熱刺激による効率的かつ汎用的な神経細胞分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of efficient and versatile method for inducing neuronal differentiation with temperature-controlled repeated thermal stimulation (TRTS)

研究代表者

工藤 忠明 (Kudo, Tada-aki)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50431606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経突起形成は、神経系の機能的形成や回復を可能にする現象である。以前、培地温度を制御可能な加熱プレートを用いた温度制御式反復温熱刺激(TRTS)依存性にラットPC12細胞の神経突起伸長を誘導する方法を見出した。しかし、この神経細胞分化誘導法にはまだ改善の余地がある。本研究の目的は、TRTSの汎用性、分化率の向上や分化誘導時の分子的機序について検討することである。シグナル阻害剤や次世代シーケンズを用いた解析により、TRTSによる神経突起形成や神経細胞分化率の向上に関与するシグナル分子やシグナル経路が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、温度制御式反復温熱刺激(TRTS)の汎用性や分化率を向上させる方法について、一定の知見を得た。またTRTSによる神経分化モデル・PC12細胞における神経突起伸長に必要なシグナル伝達分子やシグナル経路が示唆された。TRTSによりPC12細胞において発現量が上昇もしくは低下する遺伝子についても知見を新たに得た。

これらの研究成果は、PC12細胞のTRTS依存的神経突起伸長作用を裏打ちする機序やその標的シグナル分子のさらなる解明に道を開くものである。今後、TRTSの様な、プログラムにより精密に温度が制御可能な、マイルドで非侵襲的な温度刺激を用いた温熱療法の再生医学への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neurite formation is a phenomenon that enables functional formation and recovery of the nervous system. Previously, we found a method to induce neurite outgrowth of rat PC12 cells in a temperature-controlled repeated thermal stimulation (TRTS)-dependent manner using a heating plate capable of controlling the medium temperature. However, there is still room for improvement in this method, which induces neuronal differentiation. The purpose of this study is to investigate the versatility of TRTS, the molecular mechanism of differentiation induction, and to improve the differentiation rate. Analysis using signal inhibitors and next-generation sequencing suggested the signaling molecules and signaling pathways that are involved in TRTS-induced neurite formation and in improving the neuronal differentiation rate.

研究分野：生理学、分子生物学、歯科再生医学

キーワード：PC12細胞 神経細胞分化 温熱刺激 サブクローニング 骨形成タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

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の四肢麻痺に苦しむ患者数は 200 万人を超え、脳や脊髄損傷後の運動機能回復治療への需要は大きくなるばかりであった。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の再生における必須の過程である。温熱療法は、安全な癌治療の開発・実践の観点から注目を受けているが、一方で、一過性の細胞加熱(ヒートショック)が神経細胞の保護作用を発揮する可能性が報告されていた。しかし、精密な温度制御下での繰り返し温熱刺激 (temperature-controlled repeated thermal stimulation, 以下、TRTS と略す)が神経細胞分化にいかなる影響を与えるかについての研究は、世界的にみてもこれまでほとんど行われてこなかった。

我々は以前、精密なガラス製加熱プレートを神経分化モデル・ラット PC12 細胞株に適用し、TRTS が神経突起形成を誘導することを解明した (Kudo et al., *PLOS ONE*, 2015)。しかし、TRTS による分化率には改善の余地があり、また、TRTS による PC12 細胞以外の細胞株への影響も不明であり、汎用性の検討は充分ではなかった。さらに TRTS により活性化される細胞内シグナル伝達経路についても不明点が多いのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、様々な神経分化モデルに有効な TRTS 神経分化誘導法の確立、TRTS による神経細胞分化誘導効率を向上させる方法の検討および TRTS による神経細胞分化誘導の分子的機序を明らかにすること等を通じて、TRTS を応用した神経回路再編・再生療法のためのシステム開発に寄与することを研究の目的とした。また、上記研究目的を踏まえ、研究期間の年度毎に以下の研究課題を設けた。

[平成 28 年度]

TRTS による神経突起形成の促進における、培地温度上昇 / 下降相とその反復回数の重要度について PC12 細胞を用い検討すること。TRTS による神経分化モデル・マウス Neuro2A(N2A)細胞への影響も検討すること。

[平成 29 年度]

TRTS を新たに神経分化モデル・ヒト SH-SY5Y 細胞に負荷し、神経細胞分化誘導効果の有無を検討すること。TRTS により神経突起が伸長する PC12 細胞の分化率向上に向け TRTS により活性化する新規シグナル経路を検討すること。

[平成 30 年度]

TRTS 高感受性細胞株及び非感受性細胞株の樹立すること。またこれら新規樹立細胞株を活用し、実用性や汎用性向上の観点から TRTS により活性化されるシグナル経路も検討すること。

[令和元年度]

本研究で樹立した TRTS 高感受性細胞株(PC12-P1F1)及び非感受性細胞株(PC12-P1D10)を活用し、TRTS の実用性や汎用性向上の観点からこれら新規細胞株のゲノム的特徴や

TRTS により活性化されるシグナル経路を検討すること。

### 3 . 研究の方法

[平成 28 年度]

(1)PC12 細胞を用い、複数のプログラム条件の TRTS にて 6 日間分化誘導し神経細胞分化率を位相差顕微鏡により評価した。その際、現行法(3 時間加熱×6 回/日)を対照とした。

(2) N2A 細胞では 2 つの異なる加熱プレート温度設定にて TRTS 処理をした(39.5 度と 42 度)。その後、細胞傷害性や神経突起形成を評価した。また、分化誘導因子の併用試験も行った。

[平成 29 年度]

(1)増殖または分化誘導培地に播種した SH-SY5Y 細胞に、TRTS 処理 ( 3 時間×6 回/日、6 ~ 7 日間 ) を実施し(加熱プレート温度 : 39.5 度及び 42 度)、細胞増殖や神経突起形成を評価した。

(2) PC12 細胞では、各種シグナル阻害剤を用い、TRTS 依存性分化誘導に関わる新たなシグナル経路を検討した。

[平成 30 年度]

(1)培地に播種した PC12 細胞やそのサブクローンに、TRTS 処理 ( 9 時間×2 回/日、7 日間 ) を実施し、その後、細胞増殖や神経突起形成を評価した。また BMP4 や NGF による新規細胞株の分化率も評価した。

(2)TRTS 高感受性 PC12 細胞株及び TRTS 非感受性 PC12 細胞株を PC12 親細胞株からそれぞれサブクロニングするため、96 穴プレートを用いた標準的手法により細胞株のクロニングを実施した。

[令和元年度]

(1)前年度に樹立した、TRTS に対する感受性の大きく異なる 2 つの PC12 細胞派生株 ( TRTS 高感受性細胞株 PC12-P1F1 と TRTS 非感受性細胞株 PC12-P1D10 ) からゲノム DNA を回収し、全ゲノムシーケンスによりそれぞれの全遺伝情報を得て、細胞株間の塩基配列差を解析した。例えば樹立細胞株間で BMP 感受性が異なることから、各 BMP 受容体遺伝子について、遺伝子変異の有無を分析した。

(2)分化誘導培地に播種した PC12-P1F1 を用い、神経細胞分化を誘導するため、TRTS 処理(9 時間× 2 回/日)を行った。分化効率を上げるため、JNK 阻害剤も処理した。6 日後、神経突起形成度を評価した。またタイムポイント(0、3、6 日目)を定め、PC12-P1F1 細胞株の全 RNA を回収し、mRNA シーケンスにより全転写産物情報を取得した。

### 4 . 研究成果

(1)平成 28 年度

現行の TRTS 法に比べ、総加熱時間は等しいものの休止時間 ( 1 時間 ) を入れずに加熱す

る新 TRTS 法(18 時間加熱 × 1 回/日)でも、ほぼ同じ程度に神経突起形成が PC12 細胞において誘導された。また、N2A 細胞では、細胞増殖試験において現行の TRTS では影響がなかったものの、TRTS(42 度)では PC12 細胞と同様著明に細胞が傷害された。PC12 細胞と異なり、現行 TRTS 法では N2A 細胞において著明には神経突起伸長が促進されなかったが、BMP2 やレチノン酸と TRTS を併用した場合には、液性因子単独処理時に比べ、神経突起形成が有意に促進された。これらの結果は、TRTS(39.5 度)を用いた神経突起伸長誘導において、培地温度の上昇相/温度下降相における細胞温度刺激やその反復回数よりも、平衡相における細胞への温度刺激の方が、分化誘導には重要な因子として作用することを示唆する。また N2A 細胞の結果から、TRTS への感受性は細胞の種類にも依存し、その感受性は液性因子等の環境濃度により調節できる可能性も示唆された。

#### (2)平成 29 年度

SH-SY5Y 細胞における 39.5 度の TRTS 処理は、N2A 細胞と同様、細胞増殖率に影響を与えなかった。42 度の TRTS 処理では、N2A 細胞や PC12 細胞と同様、負荷開始後著しい細胞毒性を認めた。更に SHSY-5Y 細胞は、PC12 細胞と違い、39.5 度の TRTS 単独処理では神経突起形成が誘導されなかった。この点は N2A 細胞の結果と同様であったが、SHSY-5Y 細胞では、N2A 細胞と違い、TRTS はレチノイン酸依存性神経突起伸長も促進しなかった。以上より TRTS に対する感受性は細胞により異なり、TRTS の感受性を調節する分子的機序の存在が示唆された。一方 TRTS が PC12 細胞に神経突起を伸長させるシグナル経路に関し、各種阻害剤により、新たに TAK1-p38 経路及び MEK5-ERK5 経路が神経突起伸長に必須であることや JNK 阻害剤自体が分化に促進的に作用することを示唆する結果を得た。

#### (3)平成 30 年度

TRTS を用いた分化誘導実験において、樹立細胞株の神経突起伸長により分化率を評価したところ、TRTS 高感受性細胞株 PC12-P1F1 は、親細胞株より分化率が高いことが示された。一方 TRTS 非感受性細胞株 PC12-P1D10 は TRTS による分化率が極めて低かった。

代わりに BMP4 を添加し分化誘導したところ、TRTS により分化誘導した際と同じく、高感受性細胞株は親株と同様に BMP4 により神経突起を伸長させたが、非感受性細胞株は TRTS を負荷した際と同様、神経突起を伸長させた細胞がほぼ存在せず、BMP4 に対しても低い感受性を呈した。更に代わりに NGF を添加したところ、高感受性細胞株と非感受性細胞株はそれぞれ親株と同様、神経突起を伸長させた。但し分化率は、高い順に、高感受性細胞株、親細胞株、非感受性細胞株であった。以上より、PC12 細胞における TRTS 依存性神経細胞分化には、BMP シグナル経路が必要なことが示唆された。

#### (4)令和元年度

PC12 親細胞株、PC12-P1F1 細胞株及び PC12-P1D10 細胞株のゲノムを比較したところ、例えば、各 BMP 受容体遺伝子のエクソン領域はいずれも細胞株間で塩基配列に変異は特にないことが判明した。神経細胞分化過程にある PC12-P1F1 から得た全転写産物情報により、例えば TRTS による分化誘導開始後 3 日目において、69 種の遺伝子の発現が上昇

し、30種の遺伝子の発現が減少した。前者にはBMPシグナル下流遺伝子でかつBMPシグナル経路調節に関わる抑制型Smad遺伝子が含まれたことから、TRTSがBMPシグナルの活性化を通じ神経細胞分化を促進する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tada-aki Kudo, Kanako Tominami, Satoshi Izumi, Yohei Hayashi, Takuya Noguchi, Guang Hong
2. 発表標題 Establishment and characterization of neuron-like PC12-derived cell lines with hypersensitivity or hyposensitivity to temperature-regulated repeated thermal stimulation (TRTS)
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤忠明, 望月研太郎, 泉正之, 渡辺圭, 野口拓也
2. 発表標題 温度制御式反復温熱刺激による神経細胞分化調節機構の解析
3. 学会等名 平成28年度学東北大学学際科学フロンティア研究所成果報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	望月 研太郎  (Mochiduki Kentaro)  (20633499)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師   (11301)	
研究分担者	野口 拓也  (Noguchi Takuya)  (20431893)	東北大学・薬学研究科・准教授   (11301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富並 香菜子 (Tominami Kanako)  (10815351)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師  (11301)	
研究分担者	出江 紳一 (Izumi Shin-ichi)  (80176239)	東北大学・医工学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	金高 弘恭 (Kanetaka Hiroyasu)  (50292222)	東北大学・歯学研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	高木 敏行 (Takagi Toshiyuki)  (20197065)	東北大学・流体科学研究所・教授  (11301)	