

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11224

研究課題名(和文) 培養神経細胞を用いた反復経頭蓋磁気刺激法の効果機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of effects by repetitive Transcranial Magnetic Stimulation(rTMS) using cultured neuron cells

研究代表者

池田 哲朗 (Ikeda, Tetsuro)

青森大学・薬学部・准教授

研究者番号：10360489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、反復経頭蓋磁気刺激法(rTMS)がマウス脳内で抗うつ薬の作用するノルエピネフリントランスポーター(NET)を変動することを報告した。より詳細に神経様細胞PC12でrTMSの果を調べたところ、NETとそのドミナントネガティブ型NETbを変動していた。そこで、一過性にNETとNETb遺伝子をPC12に共発現すると、細胞死に関連するシグナルカスケードが変動していた。変動している遺伝子群を同定するため、RT-PCRを行い、数種類の遺伝子が変動することを確認した。同定した遺伝子のタンパク質発現レベル、タンパク質の活性の機能解析をおこなった。R5年度はこれまでの成果を国内外の学会で発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反復経頭蓋磁気刺激法(rTMS)は、磁気刺激装置による変動磁場発生によって、生体内に二次的に発生する過電流を通じて、生体内の神経組織を刺激すると考えられ、うつ病、統合失調症、神経変性疾患や脳血管障害等による高次脳機能障害の症状改善効果が報告されている。五大疾患の一つである精神疾患、高次脳機能障害へのrTMSの作用機序は不明な点が多く、その解明は急務である。rTMSにより誘導されるNETとNETbの共発現後の新規細胞死関連シグナルカスケードで変動した遺伝子群のタンパク質レベルでの解析は、これら疾患の原因の解明、予防や新薬の開発に結び付く可能性があり、本研究から大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The applicant reported that repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) modulates the norepinephrine transporter (NET), which is affected by antidepressants, in the mouse brain. When we examined the results of rTMS in the neuron-like cell PC12 in more detail, we found that NET and its dominant negative type NETb were changed. Therefore, when NET and NETb genes were transiently coexpressed in PC12, the signal cascade associated with cell death was changed. In order to identify the gene group that changed, we performed RT-PCR and confirmed that several types of genes were changed. We performed functional analysis of the protein expression levels and protein activities of the identified genes. In 2023, we presented our results so far at academic conferences both domestically and internationally.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：反復経頭蓋磁気刺激法(rTMS) ノルエピネフリントランスポーター(NET) 神経様細胞PC12

1. 研究開始当初の背景

うつ病、統合失調症、神経変性疾患や脳血管障害等による高次脳機能障害は原因が解明されておらず、複数の遺伝子の関与やネットワークの機能異常により発症すると考えられている。反復経頭蓋磁気刺激法 (rTMS) は、磁気刺激装置による変動磁場発生によって、生体内に二次的に発生する過電流を通じて、生体内の神経組織を刺激すると考えられている。rTMS により、これら疾患の症状改善効果が見受けられることは、磁気刺激により精神疾患・高次脳機能障害関連遺伝子の変動が起きていると考えられた。申請者は、rTMS がマウス脳内で抗うつ薬の作用するノルエピネフリントランスポーター (NET) を変動することを報告した。より詳細に神経様細胞 PC12 で rTMS の効果を調べたところ、NET とそのドミナントネガティブ型 NETb を変動していた。そこで、一過性に NET と NETb 遺伝子を PC12 に共発現すると、細胞死に関連するシグナルカスケードが変動していた。五大疾患の一つである精神疾患、高次脳機能障害への rTMS の作用機序は不明な点が多く、その解明は急務である。これら疾患の患者の数は増加傾向にある。NET と NETb 共発現後に変動する新規細胞死関連シグナルカスケード遺伝子を解析することは、これら疾患の原因の解明、予防や新薬の開発に結びつく可能性があり、本研究から大きな波及効果が期待できる。そのため、rTMS により誘導される NET と NETb の共発現後の新規細胞死関連シグナルカスケードに着目し、解析することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、rTMS により誘導される NET と NETb により変動する新規細胞死関連シグナルカスケードを同定し、精神疾患・高次脳機能障害の原因、予防策の知見を得ることである。

3. 研究の方法

一過性に NET と NETb を PC12 に共発現させて、変動する細胞死関連シグナルカスケードの遺伝子を同定する。

- NET発現ベクターとNETb発現ベクターを遺伝子導入試薬でPC12に導入する。
- 導入後1～3日で、TotalRNA抽出後、cDNAを合成する。
- cDNAをテンプレートにリアルタイムPCRで細胞死関連シグナルカスケードの遺伝子を同定する。

薬剤誘導性に NET と NETb を同時に共発現できる PC12 細胞株を樹立する (薬剤誘導性 NET-NETb 共発現 PC12 とする)。

- NET と NETb を薬剤誘導性に同時に発現できる pTRE3G-IRES ベクターに、NET と NETb をサブクローニングする。一過性発現に比べ、発現蛋白量を正確に調節できるため、より正確な細胞死関連シグナルカスケードの同定が可能となる。

の薬剤誘導性 NET-NETb 共発現 PC12 を用いて、と同じ方法で cDNA を合成後、の変動

する新規細胞死関連シグナルカスケードの遺伝子を正確に解析する。

4 . 研究成果

rTMS 刺激後の NET と NETb の生理学的機能を解析するため、NET、NETb、NET+NETb を一過性に PC12 細胞に発現させた。その結果、NET+NETb を発現させた PC12 細胞で、アポトーシスに関連する Caspase1,2,3,4,8,11,12 mRNA が変動した。Caspase3 が減少していたため、ハンチントン病細胞モデル（ヒトハンチンチン exon1 を薬剤誘導性に発現する N2a 細胞）に NET+NETb を発現させた。その結果、Caspase3 の酵素活性が減少し、ハンチントン病細胞モデルの細胞死を抑制した。そのため、rTMS 誘導 NET+NETb は Caspase3 を減少し、神経変性疾患を抑制する可能性が示唆された。これらの結果を国内外の学会で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田哲朗
2. 発表標題 反復経頭蓋磁気刺激法によるノルエピネフリン神経系への影響
3. 学会等名 第42回・43回Fm 研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田哲朗
2. 発表標題 反復経頭蓋磁気刺激法により判明したシグナルカスケードを利用した新薬の探索
3. 学会等名 第45回 Fm 研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田哲朗
2. 発表標題 Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) induced NET (norepinephrine transporter) and NET b regulate the expression of caspases mRNA and protein activities on PC12 cells
3. 学会等名 Society For Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田哲朗
2. 発表標題 反復経頭蓋磁気刺激法 (rTMS) 誘導NET(ノルエピネフリン・トランスポーター) + NETbはPC12細胞においてカパーゼファミリーのmRNA、酵素活性を調節する。
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------