

## 神経成長因子非誘導 PC12変異細胞に対する 超低周波振動音刺激による神経突起の誘導

小池好久 岩本壮太郎\* 福本安甫\* 平上二九三\*\* 加納良男

Infrasonic vibratory sound induces outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which NGF-induced outgrowth of neuronal processes is impaired

Yoshihisa KOIKE, Soutarou IWAMOTO\*, Yasuho HUKUMOTO\*,

Hukumi HIRAGAMI\*\* and Yoshio KANO

### 要 約

NGF 存在下の PC12変異細胞に対し、2 Hz から10Hz までの超低周波振動音刺激を、30分間、50 dB の条件の下与えた結果、5 ~10Hz の超低周波振動音刺激は、神経突起の成長を大きく促した。そして、NGF 添加のみのコントロール群に対する、神経突起成長率は8 Hz の刺激が最も高く、コントロール比で約4 倍の神経突起成長を促した。p38MAP キナーゼの活性化は、PC 変異細胞のニューロンの分化において重要な役割を果たす。そこで、PC12変異細胞において神経突起成長を促す超低周波振動音刺激が、p38MAP キナーゼの活性化によって生じるかどうかの実験を行った。その結果、2 ~10Hz の超低周波振動音刺激が、p38MAP キナーゼの活性化を高める効果が証明された。この結果は、超低周波振動音刺激の効果は、PC12変異細胞内で神経突起成長を促す p38 MAP キナーゼ・シグナル伝達経路があることを示唆している。

キーワード：PC12変異細胞、超低周波振動音、p38MAP キナーゼ

Key words : PC12 mutant cell, infrasonic vibratory sound, p38 MAP kinase

### はじめに

アルツハイマー病は、記憶機能障害・認知機能障害を中核症状とし、そこから派生する随伴症状として徘徊や、自発性の低下など様々な問題行動を呈する疾患である。このアルツハイマー病に対し、様々な研究者により音楽療法の治療効果が報告されている。Brotons M<sup>1)</sup>らはアルツハイマー病患者の随伴症状である、自発性の低下を改善する効果が音楽療法にあることを報告している。また、Asida S<sup>2)</sup>は、アルツハイマー病に対する音楽療法の治療の効果として、徘徊や運動興奮

などの問題行動の修正を挙げている。しかしながら、音楽療法の治療の効果に対する分子レベルでの解明は十分になされていない。

Skill<sup>3)</sup>らによると、刺激としての音(振動音)の生理的効果に着目した、音楽療法の新分野である振動音響療法(Vibroacoustic Therapy)がさまざまな疾病に対する治療効果があることを報告している。また、この振動音響療法の最も効果的な振動音の周波数帯域は、40~80Hz であるとも述べている。この研究を元に、我々は先の研究において、10Hz~200Hz の振動

吉備国際大学保健科学部作業療法学科

〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

\*九州保健福祉大学保健科学部作業療法学科

〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

\*\*吉備国際大学保健科学部作業療法学科

〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

Department of Occupational Therapy, School of Health Science, KIBI International University

8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

\*Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kyushu University of Health and Welfare

1714-1, Yosino-cho, Nobeoka-city, Miyazaki 882-8508, Japan

\*\*Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University

8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

音刺激が、PC12変異細胞の神経突起形成にあたる影響についての研究を行い、結果としてPC12変異細胞に対する10~100Hzの領域の振動音刺激においてcontrol群に対し約2~3倍の神経突起形成を誘導することが証明された。特に40Hzが最も高い神経突起誘導率を示した。そして、この周波数帯域の振動音刺激がp38MAPキナーゼを活性化させ、さらにその下流にあるCREBを活性化させる、p38MAPキナーゼ・シグナル伝達経路により引き起こされることが示唆された。

p38MAPキナーゼは、Erk (p42MAPK/p44MAPK)・JNKとともに哺乳類にある3つのMAPK経路のひとつである<sup>4)</sup>。Erk経路は細胞の分化の調節に重要で、JNK経路は細胞のアポトーシスの調節に関与している。しかしながらp38MAPキナーゼはアポトーシスに働くという報告と神経突起誘導に働くというまったく異なった報告があり、現在p38MAPキナーゼ経路の明確なシステムは明らかにされていない。また、CREBは転写因子で、細胞外の刺激に対する細胞の応答に、様々なシグナル伝達経路がこのCREBをターゲットとして仲介し、細胞の増殖や分化の応答の働きを行う。つまりp38MAPキナーゼ・シグナル伝達経路が、振動音刺激により神経突起形成に大きく関与したことが示唆され、音楽療法のアルツハイマー病に対する治療的効果のひとつとして振動音刺激の関与の可能性がうかがわれた。

小松<sup>5)</sup>は、振動音響療法に最も適した周波数帯域である20Hz~150Hzより低い3~6Hzの周波数帯は、医学的に有害であると述べている。今回の研究においては、2~10Hzの超低周波振動音刺激がPC12変異細胞の神経突起誘導に与える影響についての検証を行い、分子レベルでの、超低周波数帯における振動音響療法のアルツハイマーにおける影響の検証を行った。

## 方 法

### 1. 細胞の培養

実験に使用した細胞は、グリーンら<sup>6,7)</sup>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PC12細胞(米国Rockvill, MEのAmerican type culture collectionより購入)の変異細胞である。正常

なPC12細胞に神経成長因子(nerve growth factor; NGF)を作用させると、MAPキナーゼが持続して活性化し、その結果細胞分化と神経突起の成長が誘導される<sup>8)</sup>。しかし、このPC12変異細胞はNGF刺激によって正常な持続したMAPキナーゼ活性を示すにもかかわらず神経突起の形成がほとんど生じないが、NGFと同時にcAMP・カルシウムノホア・FK506などの薬剤を投与すると、高い神経突起の形成を生じるという特性を持つ<sup>9,10)</sup>。

細胞は、0.35%のグルコースを含むDMEM (Doulbco's modifid Eagle's medium)に10%馬血清と5%牛胎児血清を加え、さらに80µg/mlのカナマイシンを加えた培地を用いて継代した。全ての細胞は、37°C・5%CO<sub>2</sub>含有の状態の炭酸ガス培養器の中において培養した。また、細胞は常時マイコプラズマ感染の有無をHoechst 33258で染色して調べ、感染のないことを確認して実験をおこなった。

### 2. 超低周波数振動音の神経突起誘導

細胞は、シーラムを含むDMEMが入った25cm<sup>2</sup>のフラスコに2~5×10<sup>5</sup>の密度で平板培養し、振動器(大熊株式会社製)により産生された様々な超低周波数の振動音刺激にさらされ、その後NGFを添加し、炭酸ガス培養器内で7日間培養した。その細胞を用いて、Morooka T<sup>11)</sup>らにならない、細胞の直径の1.5倍以上の長さのものを神経突起が形成されたものとして計測した。なお、dBの測定には、ケニス社のSOUND LEVEL MATERを使用した。

### 3. p38MAPキナーゼの検出

活性化したp38MAPキナーゼの検出は、免疫ブロットング法を用いて行った。まず、PC12変異細胞の細胞100万個を25cm<sup>2</sup>のフラスコに蒔き、5日間炭酸ガス培養器で培養を行い、無血清下で超低周波振動音刺激を与え、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、10%ポリアクリドアミノゲル電気誘導で分画後ポリビニールメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質は、ホスホp38抗体を作用させてリン酸化したp38MAPキナーゼの検出を行った。

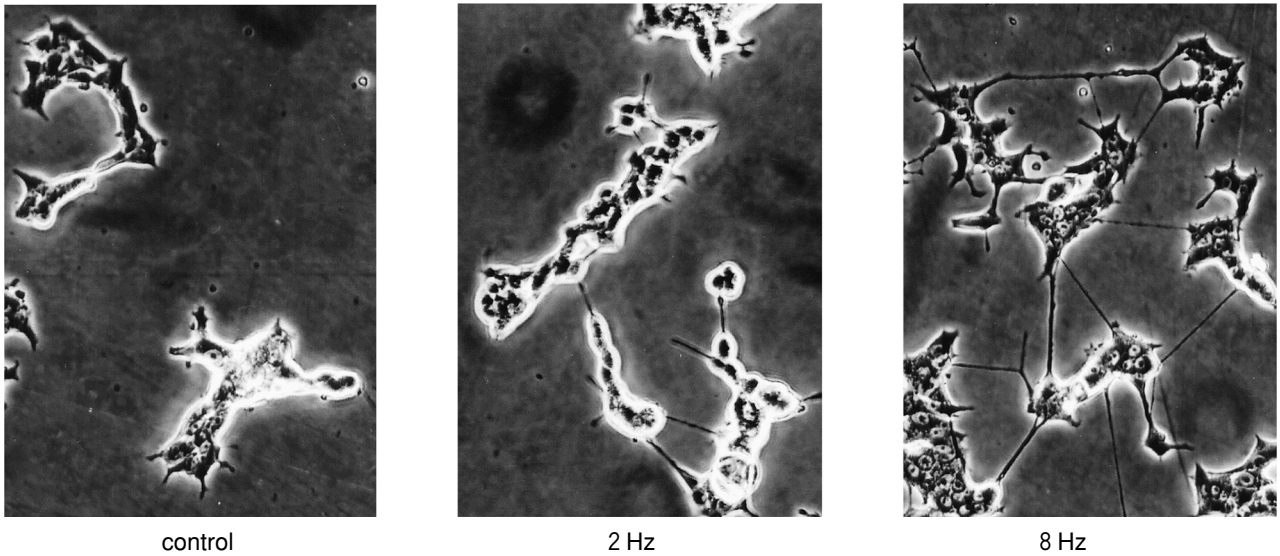


図1. 低周波振動刺激による PC12変異細胞の神経突起形成の促進

コントロール群および、2 Hz・8 Hz の振動刺激を与えた細胞群を1週間培養し位相差顕微鏡で写真撮影を行った。(×200)

#### 4. 統計解析

統計処理は、ANOVA (analysis of variance) 分散分析で有意差検定を行った後、コントロールとの多重比較検定には Bonferroni correction と、Dunnett's test を用いて解析を行った。

### 結 果

#### 1. 超低周波振動音による PC12変異細胞の神経突起の誘導

PC12変異細胞に、2～10Hz の超低周波振動音刺激を与え、その感受性をテストした。顕微鏡写真の図1. は NGF を加えたのみの PC12変異細胞と、NGF 存在下の 2 Hz と 8 Hz の振動音刺激を 50dB で 30 分間与えた PC12変異細胞の写真である。NGF 存在下で 8 Hz の振動刺激を与えた PC12変異細胞の神経突起成長は、NGF を加えただけの PC12変異細胞の神経突起形成率よりも約 4 倍と高率の神経突起形成率を見た (図 2)。

#### 2. PC12変異細胞における、8 Hz 振動音の p38MAP キナーゼの活性

我々の研究において、p38MAP キナーゼの活性化は、PC12変異細胞のニューロンの分化を促す重要な役割を担っている事がわかっており、今回の研究では、超低周波振動音刺激による p38MAP キナーゼの

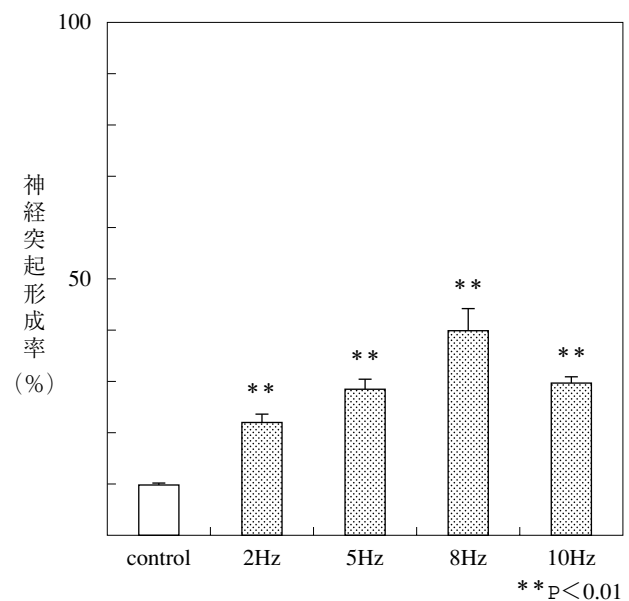


図2. 低周波振動刺激による PC12変異細胞の神経突起形成率

2～10Hz の振動刺激を 50dB で 30 分与え、NGF 1 μl 添加後 1 週間培養し、神経突起を計測した。

活性の影響の結果、PC12変異細胞の神経突起成長が誘導されるのかどうかの研究を行った。PC12変異細胞は 2 Hz と 8 Hz の振動刺激を 30 分間与えられたものと、コントロールをそれぞれ、免疫ブロッティング法にて、p38MAP キナーゼの活性化をみた (図 4)。結果は、超低周波振動音刺激では、p38MAP キナーゼの高い活性を示した。したがって、PC12変異細胞においては、振動刺激により、神経突起成長が促される p38

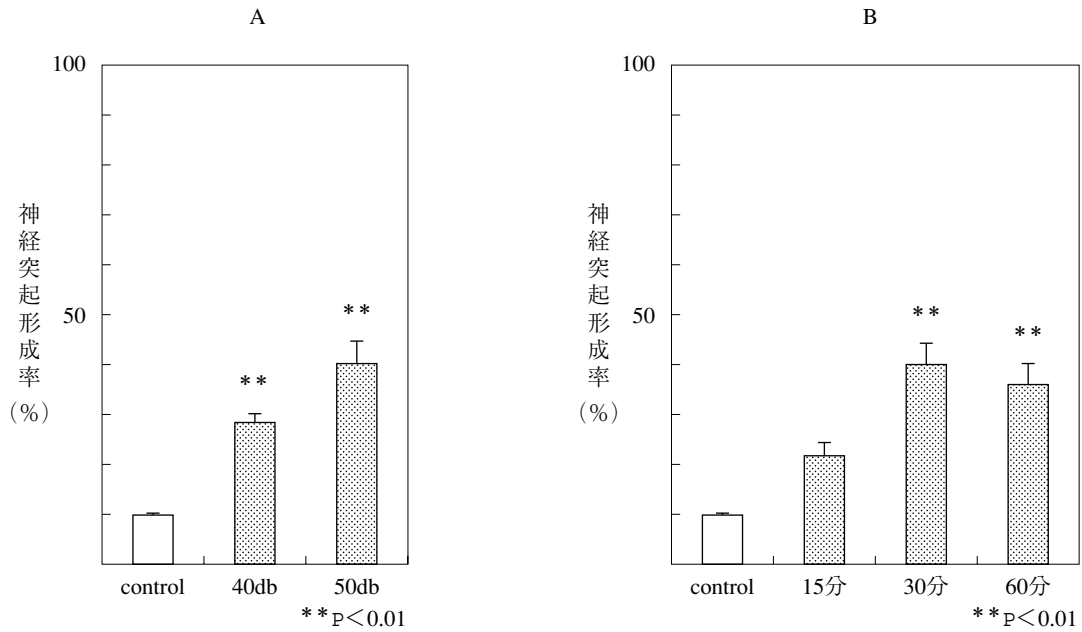


図3. 低周波振動刺激の時間と強度の変化における神経突起形成率の変化  
 (A) PC12変異細胞において振動刺激時間の変化における神経突起形成率の変化  
 (B) PC12変異細胞においてdBの変化における神経突起形成率の変化

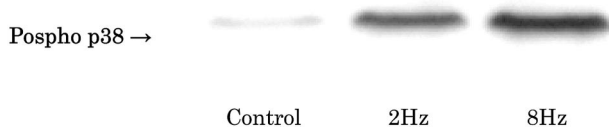


図4. PC12変異細胞における8 Hzの振動刺激によるp38MAPキナーゼの活性

PC12変異細胞に2 Hz・8 Hzの振動刺激を30分間50dBで与え、振動刺激を与えなかったコントロールと共に免疫ブロッティング法により、p38MAPキナーゼの検出を行った。

MAPキナーゼ・シグナリング経路があることを示唆している。

### 考 察

アルツハイマー病は高齢者の痴呆の原因として最も頻度の高い神経変性疾患である。遺伝子異常が確認された一部の家族性アルツハイマー病を除き、孤発性アルツハイマー病の病因については、老化が発症に深く関わっていること以外には、分子レベルでの病態解明は十分には進んでいない。ただ、アルツハイマー病の病理的特長としては、Aβの異常複合体である老人斑と、神経細胞骨格タンパク質であるタウタンパクの異常複合体である神経原繊維変化の2つがあげられる<sup>12,13)</sup>。このうち、老人斑の出現が必ずしも痴呆症状の有無や程度と関連しないことが現在指摘されてい

る。神経原線維変化に関してはその出現頻度は痴呆の程度と関連する報告がなされているが、神経原線維変化を形成しない神経細胞死も示唆されており、神経原線維変化が必ずしもアルツハイマー病の原因と断定できるまでには至っていない<sup>14)</sup>

アルツハイマー病の早期の間には、様々な成長因子やマイトジェニック (mitogen; 分裂促進剤) 化合物が亢進する<sup>15)</sup>。それらの因子の影響を最も受け細胞のMAPキナーゼの活性化が引き出され、それはさらに、APPやタウタンパクの発現の調節や翻訳後の修飾 (modification; 分子の科学的・構造的改変) にも影響を与える<sup>16,17)</sup>。

Ferrer I<sup>18)</sup>らは、神経原繊維変化のニューロンの約50~70%に、また多量のタウタンパクに強リン酸化p-38免疫反応が示されたことを報告している。さらにFerrer I<sup>19)</sup>らは、アルツハイマー病のタウの沈着とMAPキナーゼの特異な修飾の関係を線維芽細胞を用いて証明している。そして、特定のp38MAPキナーゼが、特にアルツハイマー病の疾病初期の段階において活性化することを報告している。

Raingeaud J<sup>20)</sup>らによって、p38MAPキナーゼは、浸透性のショックや、炎症性のサイトカイン・UVライト・成長因子などを含めた様々な細胞のストレスに

よって活性化され、アポトーシスに働くと報告されている。しかしながらこれらの研究においては、線維芽細胞が用いられており、PC12細胞を用いて研究を行っている Morooka T<sup>11)</sup>たちは、PC12細胞を用いて p38MAP キナーゼがニューロンの成長円錐の保持や、神経突起成長、細胞の分離作用の調節・生存に関与していると報告している。

今回の研究で、PC12変異細胞において、超低周波振動音刺激が p38MAP キナーゼを活性化させ、NGFのみ添加したコントロールに対して、約4倍の神経突起成長率を示した。また、つい最近われわれは、PC12変異細胞において、CRE (cyclic AMP response element; 環状AMP応答因子)の結合タンパクである CREB (CRE-binding protein)の活性化が振動刺激によって、活性化されることを発見した<sup>21)</sup>。CREBは転写因子で、細胞外の刺激に対する細胞の応答に、様々なシグナル伝達経路が仲介シターゲットとし、細胞の増殖や分化の応答を適応させる。p38MAP キナーゼはCRBを結合させる<sup>22)</sup>。これらの実験は p38MAP キナーゼが、PC12変異細胞において、CREBシグナル伝達経路系で神経突起の成長を促すことを示唆している。これらの実験結果から、p38MAP キナーゼが、アルツハイマー病の早期段階において、ニューロンを保護し、ニューロンの再生に働いていることが示唆される。このことより、2~100Hzにおける低周波振動音響療法がアルツハイマー病患者の、随伴症状である徘徊などの問題行動や、自発性の促進に働いているということが事実づけられたと考えられる。さらに、低い値ではあるが、今回のPC12変異細胞における神経突起の形成は、アルツハイマー病脳におけるニューロンの再生に何らかの効果があると考えられるのではないだろうか。

#### 謝 辞

本研究は平成16年度吉備国際大学保健科学部共同研究費の一部助成を受けて行いました。ここに付記して深く感謝の意を表します。

#### Abstract

In this study, PC12 mutant cells were exposed to

infrasonic vibratory sound stimuli of frequencies ranging from 2 to 10Hz for 30 minutes at 50dB under the condition of NGF treatment. The results showed that infrasonic vibratory sounds of 5–10Hz induced enhancement of neurite outgrowth. The frequency of neurite outgrowth induced by 8–Hz sound stimuli was approximately 4-fold greater than that induced by NGF alone. The activation of p38 MAPK has been shown to play an important role in neuronal differentiation in PC12 mutant cells. Therefore, author examined whether the ability of infrasonic vibratory sound stimulus to induce neurite outgrowth of PC12 mutant cells is a reflection of its effect on p38 MAPK activity. The results demonstrated that 2 to 10Hz infrasonic vibratory sound stimuli had an enhancing effect on p38 MAPK activity and indicated that vibratory sound induces neurite outgrowth via a p38 MAPK signaling pathway in PC12 mutant cells.

#### 参考文献

- 1) Brotons M. Koger SM (2000) The impact of music therapy on language functioning in dementia. *J. Music Ther* 34 : 183–185
- 2) Asida S (2000) The effect of reminiscence music therapy session on change in depressive symptoms in elderly persons with dementia. *J. Music Ther* 34 : 170–182
- 3) Skill O (1999) Vibroacoustic Therapy. *Music Therapy* 8 : 61–77
- 4) Han J. Lee JD. Bibbs L et al (1994) A map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 : 808–811.
- 5) 小松明 (1995) 体感音響装置の振動と低周波振動公害との相違について. *日本バイオミュージック学会誌* 13(1) 48–55
- 6) Greene LA(1997)A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res* 133 : 350–353
- 7) Greene LA (1982) Tischler AS. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological

- research. *Adv. cell. Neurobiol* 3 : 373–414
- 8) Erhardt P, Trappmair J, Rapp UR et al (1995) Differential Regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol* 15 : 5524–5530
  - 9) Kano Y, Hiragami F, Kawamura K (2002) Immunosuppressant FK 506 induces sustained activation of MAP kinase and promotes neurite outgrowth in PC12 mutant cells incapable of differentiating. *Cell Struct Funct* 27 : 393–398
  - 10) Kano Y, Nohno T, Hasegawa T et al (2002) Immunomodulation by FK 506 induces neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-prompted neuritegenesis via a novel MAP kinase signaling pathway. *Neurochem Res* 27 : 1647–1653
  - 11) Morooka T, Nisida E. (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem* 273 : 24285–24288.
  - 12) Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, et al (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 : 733–736
  - 13) Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ et al (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ). *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 4040–4043
  - 14) Gomez-Isla T, Hollister R, West H et al (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41 : 16–19
  - 15) Garther U, Holzer M, Aredt T (1995) Induction of p21<sup>ras</sup> in Alzheimer pathology. *Neuroreport* 6 : 1441–1444.
  - 16) Sadio E, Jaaro H, Serger R. et al (1998) Ras-signaling pathway: positive and negative regulation of tau expression in PC12 cells. *Neurochem* 70 : 428–431.
  - 17) McFarlane I, Georgopoulou N, Coughlan C. et al (1999) The role of the protein glycosylation state in the control of cellular transport of the amyloid  $\beta$  precursor protein. *Neuroscience* 90 : 15–25.
  - 18) Ferrer I, Blanco R, Carmona M et al (2001) Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurons and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain pathol* 11 : 144–158.
  - 19) Ferrer I, Blanco R, Carmona M. et al (2001) Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J. Neural Transm* 108 : 1397–1415.
  - 20) Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS et al (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem* 270 : 7420–7426.
  - 21) Takasi Y, Hiragami F, Kawamura K et al (2003) Establishment of neuro transmitter-hypersensitive PC12 variant cells deficient in nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Tiss Cult Common* 22 :
  - 22) Adam J, Michael E (1999) CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem* 68 : 821–861