

神経の生存を維持する因子の解析

加納良男 中桐佐智子* 平上二九三** 河村顕治**

Factors for long term maintenance of neuron

Yoshio KANO, Sachiko NAKAGIRI*, Fukimi HIRAGAMI**, Kenji KAWAMURA**

要 約

末梢神経の活動に関与している非神経細胞は、神経の長期生存のために必要な神経因子を供給することができ、さらにこれら非神経細胞によって作られた環境が軸索の再生にも働いている。感覚神経や交感神経を非神経細胞から分離して培養すると、その長期生存には神経因子の1つである神経成長因子 (NGF) の添加が必要となる。NGF を神経細胞に作用させると神経細胞は NGF 受容体の1つである Trk をリン酸化し、続いてシグナル伝達経路の1つである Raf-MEK-ERK 経路を活性化することで神経突起の誘導や長期生存を保っている。我々は交感神経由来の PC12細胞から NGF には反応しないが熱ショックのような物理的刺激によって神経突起の誘導や長期生存が引き起こされる新規の細胞株である PC12m3-S 細胞を開発した。PC12m3-S 細胞に物理的刺激を与えると、Raf-MEK-ERK 経路ではなく p38キナーゼ経路が活性化した。これらの結果から、PC12m3-S 細胞は物理的刺激によって p38キナーゼ経路を介した神経再生が活発となりさらに神経の長期生存を保っていると考えられた。

キーワード：PC12変異細胞、物理的刺激、p38MAP キナーゼ

Key Words：PC12 mutant cell, Physical stimulation, p38 MAP kinase

はじめに

神経細胞は、胎児期において一生働き続ける細胞が最初に作られ、生後は分裂増殖によって補充されることはなく死んでいくばかりである。その神経細胞死のスピードが異常に高まった病気がいわゆる認知症である。このことは神経細胞では単一の細胞が数十年の長期間保持されるメカニズムが備わっていることを意味している。神経細胞の長期生存に働く要因の1つに神経成長因子が考えられている。神経成長因子の1つである NGF は神経細胞の突起である軸索末端にある受容体で受け取られ、その情報が軸索内を移動して神経細胞体の核の遺伝子に伝えられ、神経の突起伸長や突

起新生 (再生) に働いている¹⁻⁵⁾。具体的には、NGF によって活性化した受容体である Trk は軸索を移動して細胞体で情報伝達を行う MAP キナーゼ (ERK) を活性化し、それが最終的に CREB 等の転写因子を活性化することで神経突起の伸長や再生を支配する遺伝子が働くようになる⁶⁾。MAP キナーゼは遺伝子の活性化のみならず2個の神経細胞を連絡するシナプスにおいても働いており神経伝達系にも関与している。

我々は、神経細胞の長期生存に神経成長因子のみが作用しているか、あるいは他に生存有利に働く要因はあるかについて興味をもった。反対に生体の内外から生存の不利や細胞死 (アポトーシス) に働く因子を検

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

*吉備国際大学保健科学部看護学科
岡山県高梁市伊賀町 8

**吉備国際大学保健科学部理学療法学科
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 Nursing, School of Health Science, Kibi International University
8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

**Department of Physical Therapy, School of Health Science, Kibi International University
8, Iga-machi, Takahashi-city, Okayama 716-8508, Japan

出する必要性も感じた。このような時に我々は、いろいろな薬剤や物理的・化学的刺激に過敏に反応して迅速に神経突起の伸長や再生を行う培養神経細胞をラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12細胞から単離し PC12m3細胞と命名した⁷⁾。PC12m3細胞の培養を数年続けている時、神経成長因子や薬剤には反応せず、熱ショック、高浸透圧、電気、紫外線等の物理的刺激によってのみ神経突起の伸長や再生を行う細胞が出現したのでクローニングを行い PC12m3-S細胞と名付けた。この細胞は物理的刺激を与えない状態では丸い形態をしており癌細胞としてどんどん増殖するのみである。この細胞の少数を25cm²のシャーレに蒔いて物理的刺激を与え1～2週間培養すると神経細胞に分化する。この神経細胞に分化した PC12m3-S細胞はその後数ヶ月間培養シャーレの中で単一の神経細胞として生き続けることがわかった。そこで本研究では、PC12m3-S細胞を用いて神経細胞の長期生存のメカニズムや長期生存に働く要因についての検討を行う。

方 法

1. 細胞と培養

実験に使用した PC12細胞は、グリーンら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⁸⁾。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80μg/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、炭酸ガス培養器を用い、5%CO₂で37℃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ー杯になるとピペッティングし、1～3×10⁴cells/cm²で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で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行なった。

2. 細胞への物理的刺激処理

細胞への物理的刺激としては高浸透圧と熱を試みた。高浸透圧処理は培地に4MのNaCl溶液を最終濃度が1.42%になるように加えることで行った。4M

のNaCl溶液は水に溶解しニトロセルロースフィルター（ポアサイズ2μm）で濾過することによって作製した。熱処理は恒温槽を用い44℃で10分、20分、30分加温することで行った。物理的刺激を施した細胞は毎週位相差顕微鏡下に写真撮影を行い、長期培養を続けた。

3. p38MAPキナーゼとAktの検出

活性化した p38MAPキナーゼとAktの検出は免疫ブロット方によって行った。方法は、各種 PC12の細胞100万個を25cm²のフラスコに蒔き、5日間培養後無血清下でNGF処理または熱処理を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10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにブロットして行った。ブロットした蛋白質はホスホ p38抗体またはホスホ Akt 抗体を作用させて、リン酸化した p38MAPキナーゼまたはAktの検出を行った。

結 果

1. 物理的刺激によって長期生存する神経細胞の出現

PC12m3の細胞100万個を25cm²のフラスコに蒔き、精製されたNGF1μlと高浸透圧あるいは熱ショック処理を行い1週間培養すると非常に高い神経突起の形成が観察される。この PC12m3系列の細胞の培養を数年続けている時、神経成長因子や薬剤には反応せず、熱ショック、高浸透圧、電気、紫外線等の物理的刺激によってのみ神経突起の伸長や再生を行う細胞が出現してきた。そこでクローニングを行なったところ1つの細胞株を単離することに成功し、PC12m3-S細胞と名付けた。この細胞は物理的刺激を与えない状態では丸い形態をしており癌細胞としてどんどん増殖するのみである（図1A）。この細胞の少数を25cm²のフラスコに蒔いて物理的刺激を与え1～2週間培養すると神経細胞に分化する。図1Bは2ヶ月経過した時の細胞であるが、この細胞の近くには他の細胞はなく、シャーレ全体でも数個～数十個しかない状態で長期間生存する。図1Cは図1Bの細胞をさらに7日間培養したものであるが、わずか7日の間に神経突起の短縮と新たな伸長を繰り返していることが判明した。

この培養系では、物理的刺激は与えたものの神経成長因子の存在しない状態で神経細胞の形態を保ち、さらに近くに他の細胞のない単一の状況下で生存し活動している。

グリア細胞を用いたマイクロアイランド法でラット海馬神経細胞を少数播くと、マイクロアイランド上に1個のニューロンのみ生存する状態で培養することができる⁹⁾。この時軸索は自分自身の細胞体や樹状突起の上に自己回帰性のシナプスであるオートプスをつくる。PC12m3-S細胞では物理的刺激を与えると神経細胞に分化するが、この時オートプスが頻繁に見られた(図1B、C)。

2. 神経細胞の長期生存に関する因子

物理的刺激によるPC12m3細胞の分化や生存の維持にp38MAPキナーゼの活性化が関与していることが判明している。そこでPC12m3-S細胞に物理的刺激を与えp38MAPキナーゼの活性を調べたところ長期生存できない親細胞に比べ優位に高い活性が観察された(図2)。また長期生存にはアポトーシスの抑制が必要であるが、Akt酵素はアポトーシス因子であるBcl-2を阻害することで生存に働いている¹⁰⁾。しかしPC12m3-S細胞ではAkt酵素活性が低いことから(図3)、p38キナーゼ経路を介した他の経路でアポトーシスの抑制がなされると考えられた。

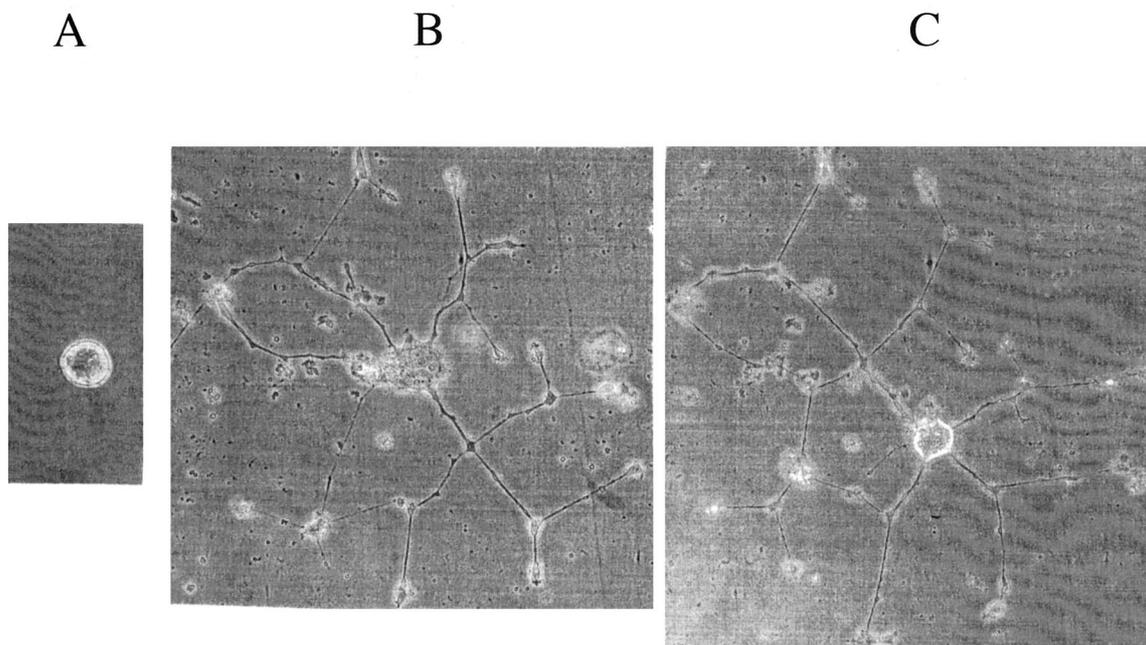


図1. 物理的刺激による神経細胞の長期生存

神経突起形成変異細胞であるPC12m3-S細胞に何の処理も行わなかった対照(A)、Aに物理的処理を与え2ヶ月間培養したもの(B)、Bをさらに7日間培養したもの(C)を位相差顕微鏡で写真撮影を行った(x200)。神経突起の伸長と短縮を繰り返し、さらにオートプスも観察される。

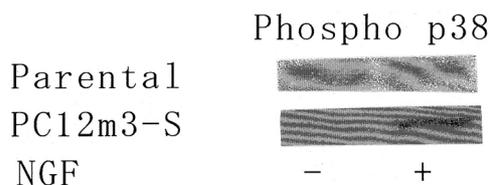


図2. NGF刺激によるp38 MAPKの活性化

神経突起形成変異細胞であるPC12m3-S細胞とその親細胞であるPC12細胞に0.5%血清下でNGF処理を行い、免疫プロット法により活性化したp38 MAPKの検出を行った。

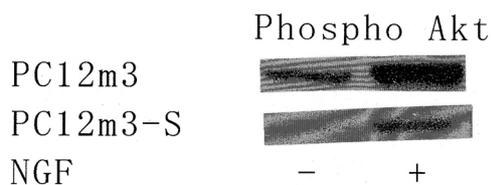


図3. NGF刺激によるAkt酵素の活性化

神経突起形成変異細胞であるPC12m3-S細胞とその親細胞であるPC12m3細胞に0.5%血清下でNGF処理を行い、免疫プロット法により活性化したAkt酵素の検出を行った。

討 論

交感神経細胞や感覚細胞それに分化したPC12細胞ではNGFを除去すると、JNKとカスパーゼが活性化して細胞死がおきることが報告されている。NGFはMAPキナーゼやp38キナーゼを活性化することで生存保持にはたらいっているのであるが¹¹⁾、PC12m3-S細胞では物理的刺激でp38キナーゼが活性化して神経細胞に分化して生存している。PC12m3-S細胞は軸索末端が自分自身の神経突起にシナプスを作るいわゆるオートプスを形成する。強固なシナプスを形成する細胞ほど生存に有利と言われているので、PC12m3-S細胞におけるp38キナーゼの活性化によるオートプス形成もPC12m3-S神経細胞の長期生存の要因の1つと考えられる。

PC12m3-S細胞の親細胞であるPC12m3細胞はNGFによるMAPキナーゼ活性は正常であるにもかかわらずNGFによる神経突起の形成はほとんどない。しかしカルシウム導入剤や免疫抑制剤等の薬剤を作用させるとMAPキナーゼの活性化と神経突起の誘導が起きる^{12,13)}。このことはPC12m3細胞はMAPキナーゼカスケード系の遺伝子のどこかに突然変異があることを示唆している。またPC12m3細胞は、熱ショックにより神経突起が誘導され、この時はMAPキナーゼの活性はなく、そのかわりp38キナーゼが異常に高い活性をもつことがわかった¹⁴⁾。PC12m3細胞の熱ショックによる神経突起の形成はp38キナーゼの阻害剤で大きく抑制されることから、p38キナーゼ活性が神経突起の形成に不可欠であることが解った。さらにp38キナーゼの阻害剤は過度の熱ショックによる細胞死を促進することから、p38キナーゼは熱ショックによる細胞死から細胞を守って生存有利に働いていることが判明した¹⁴⁾。このことからp38キナーゼ活性の亢進は神経細胞の長期生存に働く因子の1つであることが示唆される。さらにPC12m3-S細胞でもp38キナーゼ活性が亢進しているので(図2)、PC12m3-S細胞もp38キナーゼ遺伝子を検討する必要がある。

PC12m3-S細胞でp38キナーゼ活性が異常に亢進している理由として5つの可能性が考えられる。1, p38キナーゼ蛋白質が高い酵素活性を持つように変異している。2, p38キナーゼ遺伝子のプロモータ部に

変異がありm-RNAが多く作られる。3, p38キナーゼを活性化するASKやアダプター蛋白質に変異がありp38キナーゼを亢進している。4, p38キナーゼの脱リン酸化に働くp38フォスファターゼに変異があるためp38キナーゼ活性が亢進する。5, p38キナーゼの活性を抑制するAktに変異がありAkt酵素活性が低下している。以上5系列についてどこに遺伝子突然変異があるかを決定する必要がある。現在のところ5のAkt酵素はPC12m3-S細胞で活性が低下しているので(図3)Aktの変異が有力である。またPC12m3細胞のp38キナーゼ遺伝子については528塩基目のT(チミン)がC(シトシン)に変異していることが確認できたが、この変異はアミノ酸配列(アスパラギン酸)には変異がないことが判明している。現在PC12m3-S細胞における遺伝子突然変異の検出を行っている。

体はいろいろな外部環境によるストレスを受けているが、体を構成している細胞も常に体の外部あるいは内部のいろいろな刺激を受けて活動したり防御したり、あるいは細胞死に陥ったりしている。体の外部からの刺激としては主として細胞にも有害に働くいろいろなストレスである放射線、紫外線、高浸透圧、熱ショック、過酸化水素、細菌、ウイルスなどがあり、反対に主として体にも細胞にも有益に働く長寿食品、スポーツ、音楽、温泉そしてリハビリテーションなどがある。体の内部から細胞に与えられる刺激としては成長因子、ホルモン、ミネラル、酵素、サイトカインなどがあり、これらは細胞の働きを調節している。

これら有害または有益に働く外部刺激、あるいは内部刺激も細胞にとっては共通のERKやp38MAPK等の“細胞内情報伝達経路”を介することで細胞に働きかけている¹⁵⁾。細胞はこれらさまざまな内外の刺激にうまく反応して活動したり恒常性を保ったりしている。このことから刺激を上手に使うとすれば、神経細胞を元気にさせ長生きさせ、つまりは認知症の予防にもつながることになると考えている。

Abstract

Peripheral non-neuronal cells can provide trophic support for long-term neuronal survival, and the

microenvironment provided by these cells is important for the success of axonal regeneration. When peripheral sensory or sympathetic neurons are cultured in isolation from non-neuronal cells, their long-term survival is dependent upon an exogenous supply of the trophic agent, nerve growth factor (NGF). Exposure of neurons to NGF results in phosphorylation of Trk, which is a component of the NGF receptor, and subsequent activation of the Raf-MEK-ERK signaling pathway, which has been shown to play an important role in induction neurite outgrowth and long-term survival. We developed a neuronal cell line from PC12 cells, PC12m3-S, in which NGF-induced neurite outgrowth is impaired and that show neurite outgrowth and long-term survival in response to physical stimuli instead of NGF. When cultures of the PC12m3-S cells were exposed to physical stimuli, activity of p38 MAPK increased without activation of the Raf-MEK-ERK pathway. These findings suggest that physical stimuli-induced activation of p38 MAPK signaling pathway is responsible for axonal regeneration and long-term survival of PC12m3-S cells.

文 献

- 1) Paterson C S, Kemp H P, Marshall C J (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77 : 841-852
- 2) Cochran M, Black M (1985) PC12 neurite regeneration and long-term maintenance in the absence of exogenous nerve growth factor in response to contact with schwann cells. *Develop Brain Res* 17 : 105-116
- 3) Howe C L, Valletta J S, Rusnak A S, Mobley W C (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: Evidence that signaling endosomes serve as a platform for the ras-MAPK pathway. *Neuron* 32 ; 801-814
- 4) Maclnnis B L, Campenot R B (2002) Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science* 295 : 1536-1539
- 5) Hashimoto K, Guroff G, Katagiri Y (2000) Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21ras in PC12 cells. *J Neurochem.* 74 : 92-98
- 6) York R D, Yao H, Dillon T et al (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392 : 622-626
- 7) Kano Y, Hiragami F, Kawamura K et al (2001) Establishment of a drug-hypersensitive PC12 mutant clone deficient in nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Tiss Cult Res Commun* 20 : 145-153
- 8) Greene L A, Tischler A S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 2424-2428
- 9) Segal M M, Furshpan E J (1990) Epileptiform activity in microcultures containing small numbers of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 64 : 1390-1399
- 10) Martin D, Salinas M, Lopel-Valdaliso R et al (2001) Effect of the Alzheimer amyloid fragment A β (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *J Neurochem* 78 : 1000-1008
- 11) Morooka T, Nishida E (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273 : 24285-24288
- 12) Kano Y, Nohno T, Takahashi R et al (2001) cAMP and calcium ionophore induce outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which nerve growth factor (NGF)-induced outgrowth of neuronal processes is impaired. *Neurosci Lett* 303 : 21-24
- 13) Kano Y, Nohno T, Hasegawa T et al (2002) Immunosuppressant FK506 induces neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-promoted neuritogenesis via a novel MAP kinase signaling pathway. *Neurochem Res* 27 : 1647-1653
- 14) Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induced neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p

- 38 mitogen-activated protein kinase pathway. Brain Res 1026 : 302-306
- 15) Raingeaud J, Gupta S, Rogers J S et al (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental Stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation tyrosine and threonine. J Biol Chem 270 : 7420-7426