

PC12m3細胞の短波長紫外線照射による p38MAPK 経路を介した神経突起の誘導

小池好久 岩本壮太郎* 福本安甫* 平上二九三** 加納良男

Ultra Violet C irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38
mitogen-activated protein kinase pathway

Yoshihisa KOIKE, Soutarou IWAMOTO*, Yasuho HUKUMOTO*

Hukumi HIRAGAMI** and Yoshio KANO

要 旨

今回の研究では、UVC 照射による PC12細胞の変異細胞で薬物に高感受性を示す PC12m3細胞のダメージと分化について調査した。PC12m3細胞は、神経成長因子 (NGF) 存在下の UVC 照射により、急速に神経突起形成率を高めた。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40J/m²の UVC 照射刺激が最も高く、コントロール比で約25倍の神経突起成長率を促した。我々はまた、UVC 刺激による PC12m3細胞における神経突起成長の作用が p38MAPK の活性によるものかどうかの調査も行った。結果は、40J/m²の UVC 照射刺激で p38MAPK は強い活性を示した。さらに PC12m3細胞において、UVC 刺激により 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) の強い活性を見た。この CREB は、MAPK をターゲットとした転写因子である。これらのことより、PC12m3細胞における UVC 刺激による神経突起成長の作用は、p38MAPK および CREB 経路により、引き起こされることが示唆された。

キーワード：PC12変異細胞、UVC、p38MAPK

Key words：PC12 mutant cell, UVC, p38MAPK

はじめに

UVC 照射が、複雑な構造ではなく、細胞内の数個の分子を通して DNA にダメージを与え、細胞の応答を誘導するという報告が多数ある^{1,2)}。その例としては、成長因子・MAPK、そしていくつかの転写因子があげられる^{2,3,4)}。それらの中で、UVC の分子での反応である MAPK の活性は、特定の上流の分子である MAPKK のチロシンとセレオニンの二重リン酸化に

よって起こる。MAPK はシグナルカスケードの中核要素であり、それは UVC の誘導により、細胞内シグナルで核の反応を引き起こし、細胞の反応として DNA の変更遺伝子にダメージを与え、細胞の宿命を決定する結果となる^{2,5)}。

哺乳類の細胞では、3つの MAPK カスケードが明確にされている；ERK (細胞外シグナル調整キナーゼ；p42と p44がよく知られている) と JNK (c-Jun ア

吉備国際大学保健科学部作業療法学科
〒716-8508 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*

*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

**Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kyushu University of Health and Welfare
1714-1, Yosino-cho, Nobeoka-city, Miyazaki 882-8508, Japan*

**吉備国際大学保健科学部作業療法学科
〒716-8508 高梁市伊賀町 8

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

ミノール終端 キナーゼ) と p38MAPK (p38 ミトゲン活性化 キナーゼ) である。ERK は、成長因子、サイトカイン、などによって最も活性化され、特に増殖シグナルを巻き込む働きがあり、また、細胞死に逆らって保護作用にも働く⁶⁾。JNK と p38MAPK もまた、成長因子に敏感に反応するが、大きな働きとしてはストレス感受性経路があげられる⁷⁾。

先の研究により、ERK と JNK 間の活性のバランスが、人骨芽細胞での増殖や分化の調節⁸⁾、HeLe 細胞でのアポトーシスの要因の鍵となることが論証されている⁹⁾。加えてマツダらは、これら二つの経路のバランスがノーマルな人繊維芽細胞においては、UVC 照射でアポトーシスに働くこと論証している⁸⁾。さらに、イナバラは、Jurket T 細胞において、p38MAPK ではなく JNK が UVC の照射の誘導により持続的に活性化し、アポトーシスに働くこと論証している¹⁰⁾。

我々は、UVC 照射による PC12m3 細胞 (薬物高感受性 PC12 変異細胞) に起こる細胞のダメージと分化について調査した。

PC12細胞は、ラットのクロム親和性細胞腫由来の細胞である。NGF に高親和力を示し、NGF の応答に、分裂を停止し、長いニューロン突起を伸ばし、潜在的な効果を維持することができる。PC12細胞は組織培養ではニューロンモデル細胞として支持され使用されている。PC12細胞の変異細胞である PC12m3 細胞は、NGF の応答に低い神経突起の成長しか示さない。しかし、NGF 添加時において、サイクリック AMP やカルシマイシンそれにヒートショックなどの様々な刺激に応答し、高い神経突起の成長を示す。さらに、様々な刺激に反応し、ERK の高い誘導を維持している^{11,12)}。

今回の研究で、40J/m²の UVC 照射において高い神経突起の誘導が起こった。さらに、UVC にさらされた PC12m3 細胞において、p38MAPK および CREB の活性がす早くまた強く出現した。

方 法

1. 細胞の培養

実験に使用した細胞は、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 PC12細胞 (米国 Rockville, 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、MAPK 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。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 MAPK 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^{11,12)}。

細胞は、0.35%のグルコースを含む DMEM (Dulbecco's modified 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℃・5%CO₂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. 紫外線ランプと、計測器

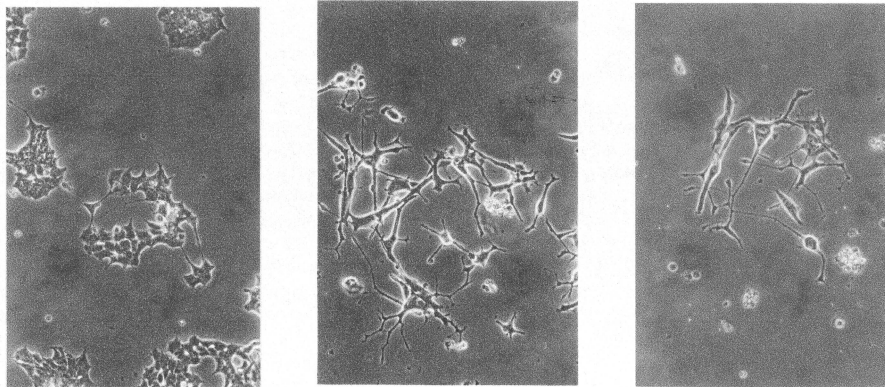
紫外線ランプは、ピーク時に245nmを放出する東芝製殺菌ランプ GL10を使用。また、UVC の計測は、MK 科学の UVC-254 センサーにて計測した。

3. 神経突起成長の決定

インキュベーション5~7日後、神経様突起の発生は神経の長さとな数を計測することで決定した。細胞の持つ一つあるいは数個の神経突起は、細胞の直径の1.5倍以上の長さのものをカウントした。

4. p38MAPK および CREB の検出

活性化した p38MAPK の検出は、免疫ブロッティング法を用いて行った。まず、PC12m3 細胞100万個を25 cm²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 UVC 照射刺激を与え、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プロットした。プロットした蛋白質は、ホスホ p38抗体およびホスホ CREB 抗体を作用



control 40J/m² 80J/m²

図1 UVC照射刺激によるPC12m3細胞の神経突起形成の促進
control群・40J/m²のUVC照射刺激群・80J/m²のUVC照射刺激群いずれにも1μlのNGFを添加し、1週間培養した後位相差顕微鏡で写真撮影を行った。(×200)

させてリン酸化したp38MAPKおよびCREBの検出を行った。

結 果

1. UVC照射刺激によるPC12m3細胞の神経突起の誘導

PC12m3細胞に、UVC刺激13~80J/m²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PC12m3細胞と、NGF存在下で40J/m²及び80J/m²のUVC照射刺激を与えたPC12m3細胞の写真である。NGF存在下で40J/m²UVC照射刺激を与えたPC12m3細胞群の神経突起成長率は、コントロール群に比べ約25倍と高率の神経突起形成率を見た(図2)。

2. PC12m3細胞における、40J/m²UVC照射刺激におけるp38MAPKおよびCREBの活性

我々の研究において、p38MAPKの活性化は、PC12m3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、UVC照射刺激によるp38MAPKの活性の影響の結果、PC12m3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。PC12m3細胞のp38MAPKとCREBの活性はNGF存在下で40J/m²UVC照射刺激を与えたものと、コントロールをそれぞれ、免疫ブロットング法にてみた(図3)。結果は、40J/m²UVC照射刺激により、p38MAPKとCREBの強い活性を見た。したがって、

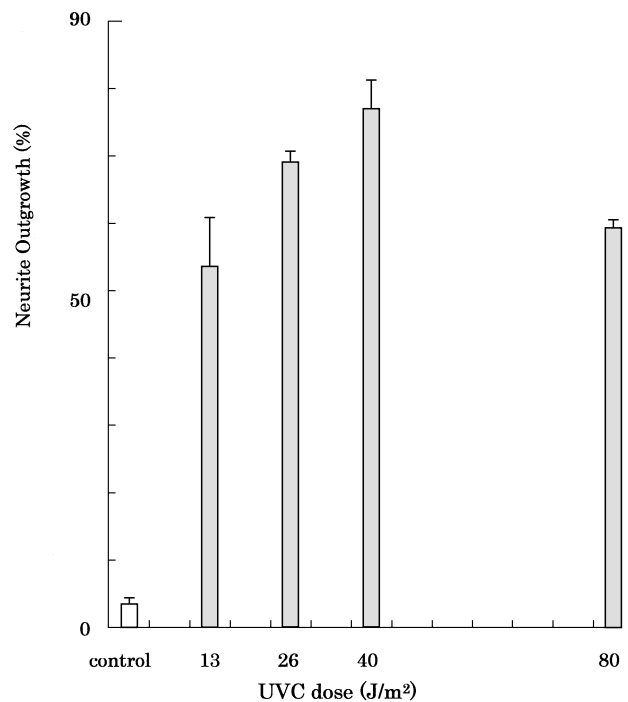


図2 UVC照射刺激によりPC12m3細胞の神経突起形成率

13~80J/m²のUVC照射後にNGFを1μl添加し、1週間培養した後に、神経突起の計測を行った。

PC12m3においては、UVC照射刺激により、神経突起成長が促されるp38MAPKとCREBシグナリング経路があることが示唆された。

考 察

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¹³⁾。それらの因子の影響を最も受け細胞の

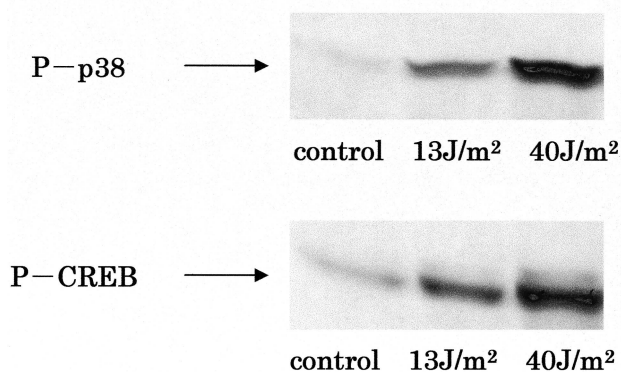


図3 PC12m3細胞における13J/m²と40J/m²UVC照射刺激によるp38MAPKとCREBの活性

PC12m3細胞においてcontrol群および13J/m²と40J/m²UVC照射刺激群のp38MAPKとCREBの活性をウエスタンブロットティング法にて検出。

MAPK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。そして、MAPKのファミリーの一員であるJNKは、神経変性疾患に重要であることが明らかにされている^{18,19}。アルツハイマー病は最も代表的な神経変性疾患であり、日本においては認知症の約半数がこの疾患であるといわれている。別の最近の研究によると、APPの重要な機能として、JNK/c-Junシグナル経路とJNK依存のアポトーシスの調節に関与しているということが報告されている¹³。Ferrer I¹⁴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らは、アルツハイマー病のタウの沈着とMAPKの特異な修飾の関係を繊維芽細胞を用いて証明している。そして、特定のp38MAPK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。またMorooka T¹³たちは、PC12細胞を用いてp38MAPK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。これらのことから、初期のアルツハイマー病の脳内において、p38MAPKがニューロンの再生や保護の働く重要な役割を果たしていることが伺われる。

高照度光療法(Bright light therapy; BLT)は、季節性感情障害(winter seasonal affective disorder; SAD)の治療に推奨されている¹⁵。また、BLTは

SAD以外のうつ病の治療や、サーカディアンリズムの低下している認知症の治療にも有効であるという報告がなされている¹⁶。最近の報告においては、とりわけ早期のアルツハイマー病において、BLTによるサーカディアンリズムの改善が、認知機能や睡眠時間の改善につながることを報告している^{17,18}。これは、視交叉上核(suprachiasmatic nucleus; SCN;サーカディアンリズムの中核)が上手く保護されている為だと考えられる¹⁸。

BLTの治療には高照度のエネルギーランプが用いられる。このランプには、紫外線をブロックするスクリーンが張られているが、この光源には本当にごくわずかではあるがUVCが含まれている。最近の研究において、光療法に含まれる紫外線が、SAD患者の定型及び非定型の症状に特異的な効果がある可能性を報告している¹⁵。他の報告において、UVAは光療法の効果的な一因ではないということを報告している¹⁹。さらに他の報告によれば、太陽光やBLTがアルツハイマー病患者の認知機能の改善につながるという報告をしている²⁰。我々の今回の研究において、UVC照射刺激がPC12m3細胞において突起成長に働くことが明らかになった。これらの結果から、わずかなUVCを含むBLTや太陽光が、アルツハイマー病のニューロンの生き残り、又は活性化に有効に働くことが推測される。

これらをまとめると、PC12m3細胞においてUVC刺激がp38MAPK・CREB経路で突起形成に働くことから、UVCによるp38MAPKの活性によりアルツハイマー病の進行が改善されることが推測された。

Abstract

We investigated damage to and differentiation of drug-hypersensitive PC12 mutant (PC12m3) cells caused by UVC irradiation. When PC12m3 cells were exposed to UVC irradiation, the frequency of neurite outgrowth rapidly increased in a dose-dependent manner in the presence of NGF. The frequency of neurite outgrowth was maximized at 40 J/m² of UVC irradiation, and this dose of UVC irradiation induced approximately 25-fold greater neurite outgrowth than that in-

duced by NGF alone. We also investigated whether the ability of UVC irradiation stimulus to induce neurite outgrowth of PC12m3 cells is a reflection of its effect on p38 MAPK activity. The results showed that p38 MAPK is strongly activated in PC12m3 cells exposed to UVC irradiation of 40J/m². Furthermore, UVC irradiation rapidly and strongly activated cyclic-AMP response element (CRE)-binding protein (CREB) in PC12m3 cells. CREB is a transcription factor that is the target of MAPK. These findings suggest that UVC irradiation induced neurite outgrowth through p38 MAPK and CREB pathways in PC12m3 cells.

参考文献

- 1) Sun Y, Yuan J, Liu H et al (2004) Role of Gab 1 in UV-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 1531–1539
- 2) Matsuda N, Hirosawa M, Wang LH et al (2000) Differential activation of ERK1/2 and JNK in normal human fibroblast-like cells in response to UVC radiation under different oxygen tensions. *Photochem Photobiol* 72 : 334–339
- 3) Oksvold MP, Huitfeldt HS, Ostvold C et al (2001) UV induces tyrosine kinase-independent internalization and endosome arrest of the EGF receptor. *J Cell Sci* 115 : 793–803
- 4) Panse RL, Dubertret L and Coulomb B (2003) p38 mitogen-activated protein kinase activation by ultraviolet A radiation in human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol* 78 : 168–174
- 5) Ibuki Y and Goto R (2002) Antiapoptotic effects induced by different wavelengths of ultraviolet light. *Photochem Photobiol* 75 : 495–502
- 6) Chouinard N, Valerie K, Rouabhia M et al (2002) UVB-mediated activation of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53. *Biochem J* 365 : 133–145
- 7) Nagata Y, Moriguchi T, Nishida E et al (1997) Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3. *Blood* 90 : 929–934
- 8) Matsuda N, Morita N, Matsuda, K et al (1998) Proliferation and differentiation osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro. *Biophys Res Commun* 249 : 350–354
- 9) Wang X, Martindale JL, Liu Y et al (1998) The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem J* 333, : 291–300
- 10) Hama-inaba H, Choi KH, Wang B et al (2001) Fas-independent apoptosis induced by UVC in p53-mutated human epithelial tumor A431 cells through activation of caspase-8 and JNK/SAPK. *J Radiat Res*, 42 : 201–215
- 11) Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induce neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res* 1026 : 302–306
- 12) Koike Y, Iwamoto S, Kimata Y et al (2004) Low-frequency vibratory sound induces neurite outgrowth in PC12m3 cells in which nerve growth factor-induced neurite outgrowth is impaired. *Tiss Cult Res Commun* 23 : 81–90
- 13) Morooka T and Nishida E (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC122 cells. *J Biol Chem* 273 : 24285–24288
- 14) Ferrer I (2004) Stress kinases involved in tau phosphorylation in Alzheimer's disease, tauopathies and APP transgenic mice. *Neurotox Res* 6 : 469–475
- 15) Lam RW, Buchanan A, Clark CM et al (1991) Ultraviolet versus non-ultraviolet light therapy for seasonal affective disorder. *J Clin Psychiatry* 52 : 213–216
- 16) Schindler SD, Graf A, Fischer P et al (2002) Paranoid delusions and hallucinations and bright light therapy in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*

- chiatry 17 : 1071–1072
- 17) Graf A, Wallner C, Schubert V et al (2001) The effects of light therapy on mini-mental state examination scores in demented patients. *Biol psychiatry* 50 : 725–727
- 18) Ancoli-Israel S, Martin JL, Gehrman P, Shochat T et al (2003) Effect of light on agitation in institutionalized patients with severe Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 11 : 194–203
- 19) Lam RW, Buchanan A, Mador JA et al (1992) The effects of ultraviolet-A wavelengths in light therapy for seasonal depression. *J Affect Disord* 24 : 237–243
- 20) Lyketsos CG, Lindell VL, Baker A et al (1999) A randomized, controlled trial of bright light therapy for agitated behaviors in dementia patients residing in Long-term care. *Int J Geriatr Psychiatry* 14 : 520–525