

高浸透圧刺激による神経細胞の分化

加納良男 中桐佐智子* 平上二九三** 小池好久 河村顕治**

Neuronal cell differentiation induced by osmotic shock

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

要 約

神経細胞は神経成長因子 (NGF) によってその神経突起の形成が誘導されるが、その時細胞内シグナル伝達に働く ERK (MAP キナーゼの 1 種) が重要な作用をされている。しかしその時同時に活性化しているもう 1 つのキナーゼである p38 MAPK の働きはまだ解っていない。p38 MAPK の働きを解明するため我々は NGF ではなく、いろいろな物理的的刺激によって神経突起が誘導される特殊な神経細胞である PC12M 3 と PC12m32 細胞を開発した。PC12m 3 と PC12m32 細胞に高浸透圧処理を施すと神経突起誘導率は PC12 親細胞のそれぞれ 10 倍と 12 倍という高い値を示した。MAPK 阻害剤を用いた実験から、この PC12M 3 細胞は高浸透圧ショックが与えられると p38 MAPK を活性化することで神経突起を誘導していることが解った。さらにドミナントネガティブ p38 をこれらの PC12 変異細胞に導入すると神経突起形成が抑制されることが判明した。これらの結果、高浸透圧刺激は、NGF によって活性化される経路とは異なる p38 MAPK 経路を用いて神経突起形成に働くことが明らかになった。

キーワード：PC12 変異細胞、高浸透圧刺激、p38 MAP キナーゼ

Key words：PC12 mutant cell, Osmotic shock, p38 MAP kinase

はじめに

ほ乳類の細胞は細胞内シグナル伝達系において、基本的には 3 種類の MAP キナーゼ経路を持っている。1 つ目は、細胞外シグナル伝達調節リン酸化酵素 (ERK) を活性化する経路であり、2 つ目は、Jun 転写因子リン酸化酵素 (JNK) を活性化する経路であり、3 つ目が p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) を活性化する経路である^{1,2)}。その内 ERK 経路は主に細胞分裂刺激によって活性化されるのに比べ、JNK と p38 MAPK 経路は炎症性サイトカインやストレスによって活性化される。そして p38 MAPK は神経細胞死に

中心的な役割を担っていると考えられている。なぜなら p38 MAPK を阻害するとその神経細胞の生存が高まるからである^{3,4)}。しかしながら、最近の研究によると p38 MAPK は、分化や神経機能を含むいろいろな働きを持っていることが示唆されている^{5,6)}。さらに p38 MAPK はラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞における、増殖因子や cAMP 誘導の神経分化に必要であることが示唆された⁷⁾。

我々は新しい PC12 変異細胞である PC12m 3 細胞を樹立したのである⁸⁾、この細胞は 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

吉備国際大学保健科学部作業療法学科
岡山県高梁市伊賀町 8

*吉備国際大学保健科学部作業療法学科
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

わず神経突起の形成がわずかにしか起こらない。しかし、PC12m3細胞にNGFと同時にカルシウムイオノホア⁶⁾や免疫抑制剤FK506⁷⁾などの薬剤を投与すると高い神経突起の形成が見られた。

高浸透圧にさらされた細胞は、細胞から水が失われることで細胞自身が縮んでしまう。このような危機に陥った細胞は元の状態に戻すために縮んだ細胞を元のようにつくらせて細胞骨格を保護強化するための適応反応を起こす^{8,9,10)}。一方イーストにおいては、このような高浸透圧に対処するためにMAPキナーゼの1種であるHog1を働かせている。Hog1の活性化は、まず最初グリセリン3リン酸脱水素酵素(GPD1)を活性化する。そしてGPD1はグリセリンを細胞内に蓄積することで細胞からの水の流出を埋め合わせるように働いている¹¹⁾。このようなメカニズムでイーストは高浸透圧から身を守っているのであるが、ほ乳類の細胞では高浸透圧にさらされるとHog1と類似の酵素であるp38 MAPKが活性化する¹²⁾。Hog1は高浸透圧によってのみ活性化されるのに対して、p38 MAPKは高浸透圧だけではなく熱ショックやサイトカインのようないろいろなストレスによっても活性化される。さらに高浸透圧によって活性化されたp38 MAPKの標的となる転写因子は何かまだ解明されていない。

そこで我々は、自ら開発したPC12m3細胞を用いてp38 MAPKの働きを解明することを試みた。PC12m3細胞は高浸透圧刺激によってPC12親細胞の10倍以上の神経突起形成の誘導が観察された。しかもその突起形成はp38 MAPKの阻害剤であるSB203580によって抑制されることが見られたのでその詳細な分析を試みた。

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¹³⁾。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80 $\mu\text{g/ml}$ 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一杯になるとピペッティングし、1~3x10⁴cells/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. 細胞への高浸透圧刺激処理

細胞への物理的刺激としては高浸透圧ショックを試みた。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。これは、4MのNaCl溶液を水に溶解しニトロセルロースフィルター(ポアサイズ2 μm)で濾過することによって作製したものである。高浸透圧処理を施した細胞は7日間培養後神経突起形成を測定した¹⁴⁾。

3. ドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子の導入

優勢に働いてp38 MAPKを阻害する遺伝子であるドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子の導入はリン酸カルシウムDNA共沈殿法によって行なった¹⁵⁾。フラスコの90%まで増殖したPC12m3とPC12m32細胞はドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子であるAGF-p38 20 μg 又は野生型p38 MAPK 遺伝子WT-p38 20 μg とネオマイシン抵抗遺伝子(pSV2 neo) 1 μg を導入した。遺伝子導入を行った細胞は、7時間後に培地交換し、さらに17時間後1:4の希釈で継代培養を行った。ドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子が導入された細胞は、ネオマイシン(G418)で選択しクローニングを行った。クローニングした細胞はPC12m32-D1, PC12m32WT-1などと命名し実験に使用した。

4. p38 MAP キナーゼの検出

活性化したp38 MAP キナーゼの検出は免疫ブロット方によって行った¹⁶⁾。方法は、PC12m3とPC12m32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高浸透圧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た。ブロットした蛋白質はホスホ p38抗体またはホスホ CREB 抗体を作用させてリン酸化した p38 MAP キナーゼの検出を行った。

結 果

1. 物理的刺激による神経突起の形成

まず最初、高浸透圧の効果を調べた。PC12m3の細胞100万個を25cm²のフラスコに蒔き、精製されたNGF 1 μ lを加え、高浸透圧になるようにNaClの濃度を1.42%に調整して1週間培養したところ、PC12m3細胞において、NGFのみを与えた対照に比べ非常に高い神経突起の形成が観察された(図1)。高浸透圧処理による神経突起形成はp38 MAP キナーゼ阻害剤であるSB203580によって大きく抑制されるが、ERKの阻害剤であるU0126では抑制されなかった。さらにドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子の導入したPC12m32細胞は高浸透圧処理を行っても神経突起の誘導は認められなかったが、野生型のp38 MAPK 遺伝子を導入したものは高浸透圧処理によって高い神

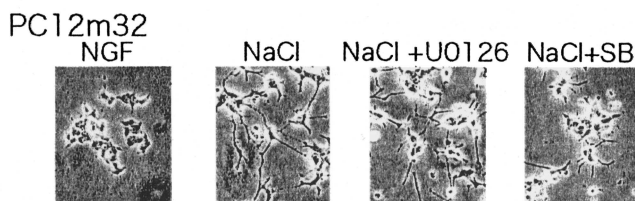


図1 高浸透圧による神経突起形成と MAPK 阻害剤の作用

神経突起形成変異細胞であるPC12m32細胞にNGF 1 μ lを添加したもの(A)、NGF 1 μ lと1.42%NaClによる高浸透圧処理を行ったもの(B)、高浸透圧処理にERK阻害剤U0126を添加したもの(C)、高浸透圧処理にp38阻害剤SB023580を添加したもの(D)を1週間培養し位相差顕微鏡で写真撮影を行った(x200)。

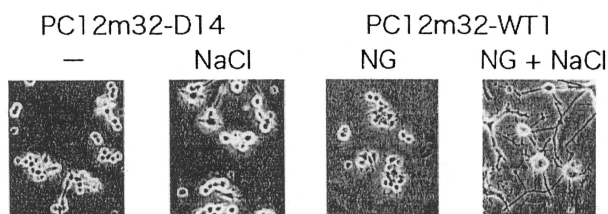


図2 高浸透圧による神経突起形成のドミナントネガティブ p38 MAPK 遺伝子による阻害

ドミナントネガティブp38 MAPK 遺伝子の導入したPC12m32細胞(PC12m32-D14)は高浸透圧処理を行っても神経突起の誘導は認められなかったが、野生型のp38 MAPK 遺伝子を導入した細胞(PC12m32WT-1)は高浸透圧処理によって高い神経突起形成が見られた。

経突起形成が見られた(図2)。

2. 高浸透圧刺激による p38 MAP キナーゼの活性化

NGFによるERKの活性化はPC12細胞の神経分化に重要な役割をもっているがp38 MAP キナーゼはどうか。

PC12m32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NFGを作用させたところPC12親細胞に比べ、PC12m32の細胞においてNGF刺激によって高いp38 MAP キナーゼの活性が見られた(図3)。次に、PC12m32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高浸透圧処理を行なったところPC12親細胞に比べ、PC12m32の細胞において高浸透圧刺激によって高いp38 MAP キナーゼの活性が見られた(図4)。

討 論

高浸透圧は細胞のp38 MAPKとERKの両方を活性化することができる。p38 MAPKの阻害剤であるSB203580は高浸透圧が誘導するCREBの活性を抑制するが、ERKの阻害剤であるU0126は作用しないことから、ERKではなくp38 MAPKが高浸透圧によってCREBを活性化するための上流のシグナル伝達タンパク質であることを示している。

PC12親細胞ではNGFによる神経突起の誘導にはERKとp38 MAPKの両方の活性が必要であるが、PC12m3細胞の神経分化にはp38 MAPKの活性のみが必要であるように思われる。我々は最初PC12m3細胞の熱ショックによる神経分化のp38 MAPKの役割について研究した⁶⁾。PC12m3細胞は44℃ 10分の熱ショック処理によってp38 MAPKが活性化し神経突起の大きな形成促進が見られた。PC12親細胞では熱ショック処理によってERKとp38 MAPKの両方が活性化されるが、PC12m3細胞では熱ショックでp38 MAPKのみが活性化される。さらに熱ショックによるPC12m3細胞のp38 MAPKのリン酸化はPC12親細胞よりはるかに高いものであった。

熱ショックによる神経突起の伸展は、p38 MAPKの特異的阻害剤であるSB203580によって阻害された。これらの見解からp38 MAPK経路の活性化はPC12m

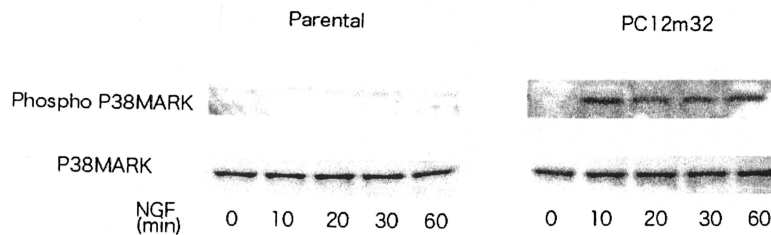


図3 NGFによるp38 MAPKの活性化

神経突起形成変異細胞であるPC12m32細胞とその親細胞であるPC12細胞に無血清下で10～50分間NGF処理を行い、免疫ブロット法によりp38 MAPKの検出を行った。

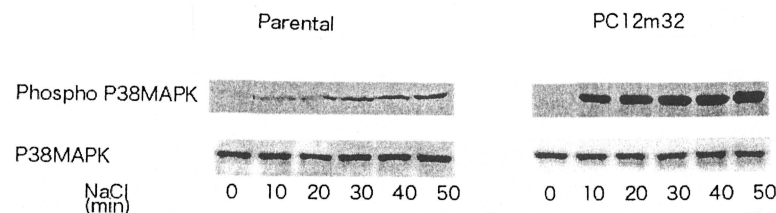


図4 高浸透圧によるp38 MAPKの活性化

神経突起形成変異細胞であるPC12m32細胞とその親細胞であるPC12細胞に無血清下で10～50分間高浸透圧処理を行い、免疫ブロット法によりp38 MAPKの検出を行った。

3細胞の熱ショックによる神経分化に必要であることが判明した。

竹田らは、アポトーシスシグナル調節酵素(ASK1)が誘導するPC12細胞の神経突起形成におけるp38 MAPKの役割について検討を行った¹⁷⁾。彼らはPC12細胞において、恒常的にASK1を働かせるとERKではなくp38 MAPKが活性化していることを見出した。ASK1誘導による神経突起の形成は、p38 MAPKの阻害剤であるSB203580によって大きく抑制されるのに対して、ERKの阻害剤では抑制されなかったのでASK1誘導の神経突起形成はERKよりむしろp38 MAPK経路が必要であることが示された¹⁷⁾。PC12細胞におけるNGF誘導の神経分化はERK阻害剤で抑制されERK経路の活性化が必要であることから^{5,8)}、我々は高浸透圧や熱ショックそれにASK1による神経誘導に使われるシグナル伝達経路はERK経路とは全く異なるものであると考えている。

Abstract

Although it is known that sustained activation of classical mitogen-induced protein kinase (MAPK, also known as ERK) induced by nerve growth factor (NGF) plays an important role in the induction of neu-

rite outgrowth, the role of p38 MAPK in neural cell function is still not clear. We developed two neuronal cell lines from PC12 cells, PC12m3 and PC12m32, in which NGF-induced neurite outgrowth is impaired and that show neurite outgrowth in response to hyperosmotic shock. The frequencies of neurite outgrowth of PC12m3 and PC12m32 cells induced by osmotic shock were approximately ten- and twelve-fold greater, respectively, than that in PC12 parental cells. The p38 MAPK pathway inhibitor SB20358 but not the ERK pathway blocker U0126 inhibited the ability of PC12m3 and PC12m32 cells to induce neurite outgrowth in response to osmotic shock. Furthermore, expression of a nonactivable form of p38 but not that of wild-type p38 significantly blocked neurite outgrowth induced by osmotic shock. These findings indicate that activation of a p38 pathway distinct from the NGF signaling pathway is required for neurite outgrowth.

文 献

- 1) Zhu X, Rottkamp CA, Hartzler A et al (2001) Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. J Neurochem 79:311-318

- 2) Huang C, Borchers CH, Schaller MD et al (2004) Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol* 164 : 593–602
- 3) Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S et al (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272 : 18518–18521
- 4) Yilmaz A, Kliche S, Mayr-Beyrle U et al (2003) p38 MAPK inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 306 : 730–736
- 5) Morooka T, Nishida E (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273 : 24285–24288
- 6) Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res* 1026 : 302–306
- 7) Thomas V, Hansen O, Rehfeld JF et al (2000) Cyclic AMP-induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 75 : 1870–1877
- 8) Wadegger S, Lang F (1998) Cell volume and gene expression. *J Membr Biol* 162 : 95–100
- 9) Novick P, Botstein D (1985) Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* 40 : 405–416
- 10) Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton : phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* 118 : 561–571
- 11) Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM et al (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 14 : 4135–4144
- 12) Han J, Lee JD, Bibbs L (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 : 808–811
- 13) 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
- 14) 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
- 15) Gorman CM, Padmanabhan R, Howard BH (1983) High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells. *Science* 221 : 551–553
- 16) Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y (1999) Mouse semaphoring H induces PC12 cell neurite outgrowth activating ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca^{2+} influx. *J Biol Chem* 274 : 29666–29671
- 17) Takeda K, Hatai T, Hamazaki TS (2000) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem* 275 : 9805–9813

