

**Prostaglandin E₂ による
運動ニューロン分化誘導に関する神経薬理学的研究**

南郷 拓嗣

2020

目次

第一章 緒言.....	1
第二章 Prostaglandin E ₂ が NSC-34 の細胞増殖及び神経突起伸長に及ぼす影響	6
2-1 序論.....	7
2-2 実験方法.....	9
2-3 結果.....	13
2-4 考察.....	21
2-5 小括.....	23
第三章 Prostaglandin E ₂ により神経突起を伸長した NSC-34 の運動ニューロン特性の評 価.....	24
3-1 序論.....	25
3-2 実験方法.....	27
3-3 結果.....	31
3-4 考察.....	42
3-5 小括.....	46
第四章 総括.....	47
参考文献.....	50
謝辞.....	59

略語一覽

AC: adenylate cyclase, ACh: acetylcholine, aCSF: artificial cerebrospinal fluid, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, ANOVA: analysis of variance, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, ChAT: choline acetyltransferase, COX: cyclooxygenase, dbcAMP: dibutyryl-cAMP, DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium, ECL: enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents, EP: E-prostanoid receptor, FBS: fetal bovine serum, IPHC: isopropyl homocholine, LDH: lactate dehydrogenase, MAP2c: microtubule-associated protein 2c, MEM-NEAA: Minimum Essential Medium non-essential amino acid, Mg-ATP: adenosine 5'-triphosphate magnesium salt, mPGES-1: microsomal PGES-1, MTT: [3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium, Nav: voltage-gated sodium channel, PGE₂: prostaglandin E₂, PGES: prostaglandin E synthase, PGH₂: prostaglandin H₂, PI: propidium iodide, PLA₂: phospholipase A₂, RA: retinoic acid, RIPA: radioimmunoprecipitation assay, SDS: sodium dodecyl sulfate, Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane, TEA-Cl: tetraethylammonium chloride, TTBS: Tween Tris buffered saline, TTX: tetrodotoxin, VAcHT: vesicular acetylcholine transporter.

第一章

緒言

神経変性疾患は、ニューロンが変性・脱落し、神経系の機能が消失する疾患で、現在まで、根本的治療法は確立されておらず、薬物治療は進行遅延及び症状緩和に留まっている。近年、胚性幹細胞(ES 細胞)及び人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が樹立され、種々のニューロンを調製することが可能となり、神経変性疾患に対する根本的治療法の開発に貢献することが期待されている。なかでも、患者本人の体組織から樹立した iPS 細胞由来のニューロンは、失われたニューロンを補填する再生医療実現における最大の障害である拒絶反応を回避できるという大きなメリットがあるため、高精度かつ効率的に目的の細胞へ分化させる培養技術に関する研究が精力的に行われている(1)。また、患者由来の iPS 細胞から調製したニューロンは、それぞれの患者の病態を再現したモデル細胞として、発症メカニズムの解明研究や治療薬のスクリーニングにも利用されつつある(2,3)。

骨格筋の収縮を支配する運動ニューロン(4)の選択的な変性・脱落は、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)や脊髄性筋萎縮症などの筋萎縮と筋力低下を主体とする極めて予後不良な運動ニューロン病を引き起こす(5,6)。特に ALS は、多くの患者が、発症後 5 年以内に呼吸筋麻痺や嚥下障害により死亡する極めて進行の速い病態を示すだけでなく、わずかに進行を遅らせる程度の薬物治療しかできないため、iPS 細胞を用いた再生医療への期待は非常に大きい。一般に、iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導には、運動ニューロンの発生に必須なシグナル分子である retinoic acid (RA)が用いられているが、現在利用されている分化誘導法では 1 ヶ月以上の期間が必要あり(7)、臨床応用のために、より短時間で成熟した運動ニューロンへと分化させる誘導法の開発が切望されている。そのため、国内外を問わず、運動ニューロン分化誘導作用を有する遺伝子や低分子化合物の探索が盛んに行われ、それらを利用した分化誘導法の開発研究も行われている(8-10)。

マウスの神経芽腫細胞と脊髄細胞の融合細胞である NSC-34 は、運動ニューロン様株化細胞で、低血清培地中で RA を処置すると、細胞増殖が停止して、神経突起が伸長し、 β III-tubulin などのニューロンの細胞骨格タンパク質及び HB9 などの運動ニューロン特異的なマーカータンパク質の発現が増加する。これらのマーカータンパク質の上昇が運動ニューロンの初代培養系とほぼ同様であることから、NSC-34 は、RA 処置により運動ニューロン様の細胞へ分化すると考えられており(11-14)、運動ニューロンモデル細胞として細胞死誘導機構の解明(15,16)や保護薬のスクリーニング(17)に用いられると同

時に、未処置の NSC-34 は、運動ニューロンの前駆細胞として分化誘導作用を有する低分子化合物の探索に汎用されている(18-21)。

Prostaglandin E₂ (PGE₂)は、生体膜の構成成分であるアラキドン酸に由来する生理活性物質である。Phospholipase A₂ (PLA₂)によって生体膜のリン脂質から遊離したアラキドン酸は、cyclooxygenase (COX)により代謝され、prostaglandin H₂ (PGH₂)を生成する。この PGH₂ を起点として様々なエイコサノイドが産生される。PGE₂ は、PGH₂ が PGE₂ 合成酵素である prostaglandin E synthase (PGES)の作用を受けて生成される(22)。生成された PGE₂ は、E-prostanoid receptor (EP)を介して、炎症(23)、発熱(24)、痛覚過敏(25)、覚醒(26)といった多様な生理作用に関与することが知られている。EP には、EP1、EP2、EP3 及び EP4 の 4 つのサブタイプが存在し、いずれも G タンパク質共役型受容体である(27)。

PGE₂ は、ALS 患者及び病態モデルマウスの脊髄において増加することが報告されている(28,29)。そこで、当研究室では、G93A 変異型ヒト superoxide dismutase-1 が導入された ALS モデルマウス(G93A マウス)において、PGE₂ が ALS の発症や進行に及ぼす影響について検討し、脊髄のミクログリアや運動ニューロンにおける microsomal PGES-1 (mPGES-1)の発現増加が、脊髄における PGE₂ の増加に関与すること(30)、マウス脊髄運動ニューロン及び運動ニューロン様に分化した NSC-34 には EP2 及び EP3 が分布し、EP2 の活性化が細胞死を誘発すること(31)、ALS の進行期における腰髄の PGE₂ 増加は、EP2 のさらなる発現増加を介して運動ニューロンの脆弱性をもたらすこと(32)を明らかにしてきた。また、他の研究者によって、PGE₂ は、ラット初代培養大脳皮質ニューロンにおいて、細胞死を誘導すること(33)、及び 6-hydroxydopamine 誘発性パーキンソン病モデルマウスの脳において、mPGES-1 により合成された PGE₂ が、黒質ドパミン作動性ニューロンの細胞死の誘導に重要な役割を果たすことも報告されている(34)。このように、PGE₂ は運動ニューロンだけでなく複数のニューロンにおいて細胞傷害性を示すことが明らかになっている。

これに対し、骨髄、結腸もしくは肝臓を損傷したマウスにおいて、PGE₂ 代謝酵素である 15-prostaglandin dehydrogenase 阻害薬の SW033291 が、損傷した組織の修復を促進することが報告され(35)、PGE₂ が組織修復を担う幹細胞及び前駆細胞に及ぼす影響も注目されている。また、COX-2 阻害薬の meloxicam 及び nimesulide がマウス嗅球におけるニューロン新生を抑制すること(36)、PLA₂ activating protein ホモ欠損マウスの胎

児において、脳内の PGE₂ レベルの低下に伴い、大脳皮質における未熟なニューロンの数が増加すること(37)が報告され、PGE₂ は、ニューロンの発生・分化にも重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。しかしながら、PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響について検討された例はない。

本研究では、RA より迅速な運動ニューロン分化誘導法の確立を目指して、このように多様な生理活性を持つ PGE₂ が新たな分化誘導因子となるか否かを様々な角度から検討することを目的とし、NSC-34 において、PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響を形態学的、電気生理学的及び生化学的特性から精査し、RA 処置の場合と比較した。

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

1. **Nango H**, Kosuge Y, Miyagishi H, Sugawa K, Ito Y, Ishige K. Prostaglandin E2 facilitates neurite outgrowth in a motor neuron-like cell line, NSC-34. *J Pharmacol Sci.* 2017;135:64–71.

第二章

Prostaglandin E₂ が NSC-34 の細胞増殖及び神経突起伸長に及ぼす影響

2-1 序論

PGE₂ 受容体である EP は、4 つのサブタイプが存在し、いずれも G タンパク質共役型受容体である(27)。EP1 は、Gq タンパク質と共役し、その活性化は、phospholipase C を活性化し、inositol trisphosphate 受容体を介した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こす。EP2 及び EP4 は、Gs タンパク質と共役し、adenylate cyclase (AC)を活性化させ、細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)を上昇させる。EP3 には、選択的スプライシングによって、C 末端の異なるアイソフォームが産生され、マウスでは α 、 β 、 γ の 3 つの存在が報告されている(27)。EP3 α 及び EP3 β は、Gi タンパク質共役型受容体であり、AC の活性を抑制することで細胞内 cAMP を減少させる。一方、EP3 γ は、Gi タンパク質及び Gs タンパク質の両方と共役することが報告されており、共役する G タンパク質が条件により変化するため、伝達するシグナルを多様なものに行っていることが明らかにされている(38)。このように EP はサブタイプにより異なるシグナル伝達経路を活性化する。また、組織や細胞の種類によって EP のサブタイプの発現パターンが異なることから、PGE₂ は標的とする細胞に応じて多彩な作用を示すと考えられている(27)。

神経前駆細胞からニューロンへの分化では、細胞周期からの逸脱による細胞増殖の停止の後、細胞の性質や形態の転換が生じ、分化・成熟すると、複数本の短い樹状突起と一本の長い軸索が伸長する(39)。樹状突起は、他の細胞から放出された神経伝達物質を受容し、その刺激を電気信号に変えて細胞体に伝え、軸索は、末端から神経伝達物質を放出し、他の細胞へ情報を伝える(40)。また、樹状突起と軸索は、まとめて神経突起と呼ばれ、その伸長は、培養神経芽腫細胞や神経幹細胞からニューロンへの分化の形態学的指標のひとつとして用いられている(41–43)。

PGE₂ は、これまでに、培養マウス脊髄後根神経節ニューロンにおいて、EP2 を介して神経突起伸長を促進すること(44)、及びラット感覚ニューロン様株化細胞 ND7/23 において、EP4 を介して神経突起伸長を促進すること(45)が報告されている。一方で、メカニズムは不明なものの、PGE₂ がマウス神経芽腫細胞 Neuro-2a の神経突起を退縮させることも報告されている(46)。このように、PGE₂ は、神経突起の伸長に対して相反する作用が報告されているだけでなく、細胞の種類により関与する EP サブタイプも異なる可能性が高いため、突起伸長作用は、目的とする細胞毎に検討する必要があると考えられる。

本章では、PGE₂ が運動ニューロンの分化に及ぼす影響を明らかにするために、未分化の NSC-34 を用いて、EP の発現を調べるとともに、PGE₂ の細胞増殖及び神経突起伸

長に及ぼす影響について検討した。

2-2 実験方法

1. 使用試薬

PGE₂、Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)、[3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium (MTT)、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び phosphatase inhibitor cocktail 3 は Sigma Aldrich より、fetal bovine serum (FBS)、penicillin-streptomycin (10,000 U/mL) 及び propidium iodide (PI) は Thermo Fischer Scientific より、butaprost、sulprostone、PF-04418948 及び L-798,106 は Cayman Chemical より、アクトシン®注射用 (dibutyryl-cAMP: dbcAMP) は第一三共株式会社より、lactate dehydrogenase (LDH)-Cytotoxic Test Wako は富士フイルム和光純薬株式会社より、enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (ECL) は GE Healthcare Biosciences より、complete protease inhibitor cocktail は Roche より購入した。その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社より特級試薬を購入した。

2. 使用抗体

anti-EP1 rabbit polyclonal antibody、anti-EP2 rabbit polyclonal antibody、anti-EP3 rabbit polyclonal antibody、anti-EP4 rabbit polyclonal antibody は、Cayman chemical より、anti-caspase-3 rabbit monoclonal antibody は Cell Signaling Technology より、anti-β-actin mouse monoclonal antibody は Sigma Aldrich より、anti-rabbit-IgG-HRP 及び anti-mouse-IgG-HRP は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

3. 細胞培養

NSC-34 は、Dr. Neil Cashman (University of Toronto)より供与された。NSC-34 は、10% FBS 及び 100 units/mL penicillin、100 units/mL streptomycin を含む DMEM を用いて、5% CO₂、37°C、加湿下で継代培養した。実験では、培養プレート(IWAKI)に 12,500 cells/cm² で播種し、24 時間培養した細胞に各試薬を処置した。本研究における全ての実験には、5 ~ 15 代目の細胞を用いた。

4. 細胞増殖の評価

細胞増殖は、MTT 法により評価した。試薬処置終了後、MTT を含む培地(MTT の終

濃度 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に交換し、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、加湿下で 3 時間インキュベート後、生成したホルマザン色素を可溶化させるため、MTT 溶解液(50% N, N-dimethylformamide、20% sodium dodecyl sulfate (SDS)、pH 4.7)を加え、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、加湿条件下で一晩インキュベートした。マイクロプレートリーダー(SH-1000Lab, Corona Electric)により吸光度(測定波長 570 nm、参照波長 655 nm)を測定した。各処置群の MTT 値は、無処置群の吸光度を 100%として算出した。

5. 神経突起伸長作用の評価

神経突起伸長細胞の評価は、Oda らの方法(47)に従って行った。試薬処置終了後、位相差顕微鏡(IX71, Olympus)を用いて撮影し、無作為に 50 個の細胞を選択した。選択した細胞のうち、Fig. 1 に示したように全長が細胞体の 2 倍以上の細胞を神経突起伸長細胞とし、その割合で示した。

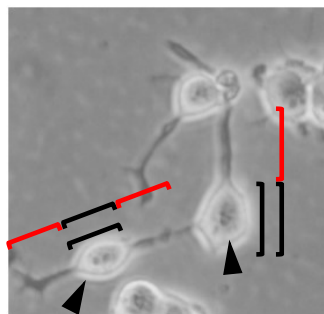


Fig. 1 Neurite outgrowth assay. Representative microscopy image of typical differentiated NSC-34 cells. Black lines indicate cell soma lengths. Red lines indicate Neurite lengths. Arrow heads indicate neurite-bearing cells.

6. 細胞傷害性評価

細胞傷害性は、PI 染色及び LDH 法により評価した。

(1) PI 染色

試薬処置終了 30 分前に培地中に PI (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加し、インキュベートした。処置終了後、新しい培地に交換し、倒立型蛍光顕微鏡(IX70, Olympus)を用いて撮影した。細胞傷害率は、位相差顕微鏡像から無作為に選択した 50 個の細胞における PI 陽性細胞の割合で示した。

(2) LDH 法

試薬処置終了後、培地の上清 50 μL を新しいプレートに移し、測定キット(LDH-

Cytotoxic Test Wako)を用いて LDH 量を測定した。測定キットのプロトコルに従い、LDH 発色試薬を 50 μ L 添加し、45 分間室温でインキュベートした後、0.5 M HCl を 100 μ L 加え、発色反応を停止し、マイクロプレートリーダー(SH-1000Lab, HITACHI)により吸光度(測定波長 570 nm)を測定した。LDH 放出量は、0.2% Tween-20 を処置した細胞の吸光度を 100%として算出した。

8. Western blot 法

試薬処置終了後、細胞を radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl、1% nonidet P-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl (pH 8.0)、1% triton X-100、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid、complete protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2、phosphatase inhibitor cocktail 3)で回収し、handy sonic (UR-20P, TOMY SEIKO)でホモジナイズした。4°C、10,000 x g で 10 分間遠心し、得られた上清を抽出液とした。タンパク定量は、bovine serum albumin をスタンダードとして Bradford の方法(48)で行った。タンパク濃度が 1 mg/mL になるように 4 x sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、40% glycerol、20% 2-mercaptoethanol、0.04% bromophenol blue)及び RIPA buffer を用いて希釈し、5 分間煮沸したものをサンプルとした。ポリアクリルアミドゲルを調製し、各レーンに同一量のタンパク質を含むようにサンプルをアプライし、電気泳動を行った。泳動終了後、セミドライ式転写装置(Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad)を用いて、semi-dry buffer (48 mM Tris、39 mM glycine、20% methanol、0.001% SDS)により、メンブレン(ImmobilonTM-P Transfer Membrane, Millipore)に転写した。その後、メンブレンを 5% skim milk を含む Tween Tris buffered saline (TTBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、137 mM NaCl、0.05% Tween-20)中、室温で 1 時間振盪した。TTBS で洗浄した後、anti-EP1 rabbit polyclonal antibody (1:1000)、anti-EP2 rabbit polyclonal antibody (1:1000)、anti-EP3 rabbit polyclonal antibody (1:1000)、anti-EP4 rabbit polyclonal antibody (1:1000)または anti-caspase-3 rabbit polyclonal antibody (1;1000)と 4°C で一晩反応させた。翌日、TTBS で洗浄し、anti-rabbit-IgG-HRP (1:20000)と室温で 1 時間反応させ、ECL により発光させた。その後、anti- β -actin mouse monoclonal antibody (1:2000)と室温で 1 時間、次に anti-mouse-IgG-HRP (1:40000)と室温で 1 時間反応させ、ECL により発光させた。得ら

れたバンドは、Scion Image (Scion corporation)で解析した。

9. 統計学的処理

値は、平均値±標準偏差または平均値±標準誤差で示した。有意差検定には、2 群では Student's *t*-test を、3 群以上では one-way analysis of variance (ANOVA)の後 Dunnett's test もしくは Tukey's test を用いた。

2-3 結果

1. 未分化の NSC-34 における EP の発現

播種 24 時間後の NSC-34 における EP の発現を western blot 法で検討した(Fig. 2)。EP1 から EP4 までの全てのサブタイプがタンパク質レベルで発現していることが報告されているマウス海馬(49)をポジティブコントロールとして用いた。本研究においても、マウス海馬では全てのサブタイプの発現が認められた。これに対して、NSC-34 では EP2 及び EP3 の発現が認められたが、EP1 及び EP4 の発現は認められなかった。

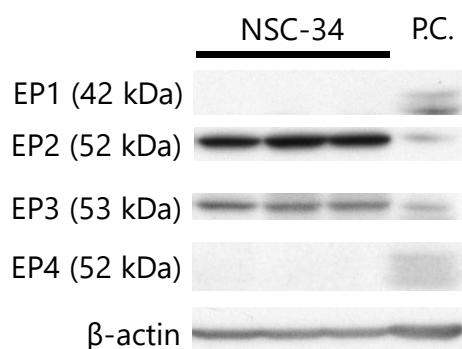


Fig. 2 Expression of EP receptors in undifferentiated NSC-34 cells. Photographs show representative western blots of EP1-4 in undifferentiated NSC-34 cells. Mouse hippocampus lysate was used as a positive control. β -actin was used as an internal control. Representative data from three separate experiments are presented. P.C., positive control.

2. PGE₂ 及び EP 作動薬が細胞増殖に及ぼす影響

PGE₂ 及び EP 作動薬が未分化の NSC-34 の細胞増殖に及ぼす影響について、MTT 法を用いて検討した(Fig. 3)。PGE₂ (1-100 μ M)を NSC-34 に 48 時間処置したところ、MTT 値は濃度依存的に減少した。また、100 μ M PGE₂ 処置細胞の MTT 値は、 $58.7 \pm 2.7\%$ で、vehicle 処置細胞($99.8 \pm 4.3\%$)と比較して、有意な減少であった。EP2 作動薬である butaprost (1-20 μ M)の処置も、濃度依存的に MTT 値を減少させ、20 μ M 処置で $58.6 \pm 3.5\%$ まで減少した。EP1/EP3 作動薬である sulprostone (1-20 μ M)は、10 μ M 及び 20 μ M 処置で、各々 $80.1 \pm 1.2\%$ 及び $82.2 \pm 1.4\%$ まで減少させた。

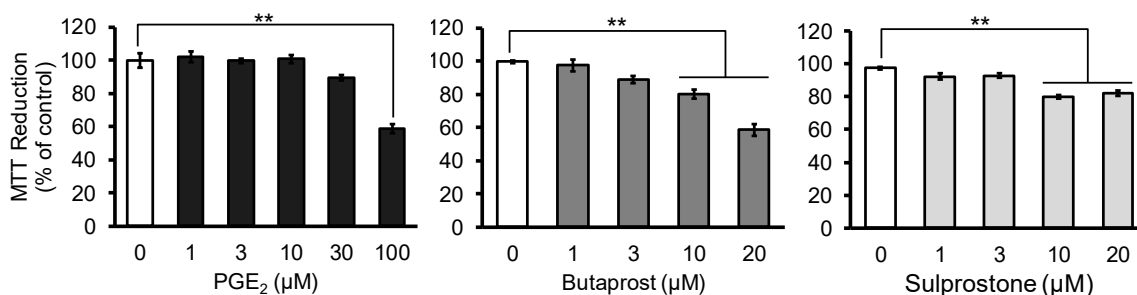


Fig. 3 Effects of PGE₂ and EP agonists on the proliferation of undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with various concentrations of PGE₂, butaprost (an EP₂ agonist) or sulprostone (an EP₁/EP₃ agonist). After 48 h of treatment, the proliferative potential of the cells was evaluated by MTT reduction assay. Values are indicated as percentages relative to non-treated cells in each case. Each value represents the mean \pm S.E.M., n=4. **P<0.01.

3. PGE₂ 及び EP 作動薬が細胞死に及ぼす影響

MTT 値の減少は、細胞増殖能の低下による細胞数の減少だけでなく、細胞死による生細胞数の減少も反映する可能性がある。そこで、PGE₂ 及び EP 作動薬による MTT 値の減少に細胞死が関与するか否かを PI 染色法により検討した(Fig. 4)。NSC-34 に H₂O₂ (300 μM)を 4 時間処置したところ、死細胞を示す PI 陽性細胞が観察され、その割合は $44.8 \pm 4.9\%$ であった(Fig. 4A)。この PI 染色条件を用いて、PGE₂ 処置が及ぼす影響を検討したところ、MTT 値の有意な減少が認められた PGE₂ (100 μM)処置群における PI 陽性細胞の割合は、 $1.8 \pm 0.8\%$ で、vehicle 処置群($1.8 \pm 0.5\%$)と同程度であり、PGE₂ 処置による PI 陽性細胞の増加は、観察されなかった(Fig. 4A)。同様の条件で、butaprost 処置及び sulprostone 処置が細胞死に及ぼす影響についても検討した。MTT 値の有意な低下が認められた butaprost 及び sulprostone の 20 μM 処置後の PI 陽性細胞はそれぞれ $2.0 \pm 0.7\%$ 及び $3.5 \pm 0.6\%$ で、vehicle 処置細胞と比較して、有意な変化は認められなかった(Fig. 4A)。また、PGE₂ (100 μM)処置は、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性化体 cleaved caspase-3 (17 kDa)の発現に影響を及ぼさなかった(Fig. 4B)。さらに、PGE₂ (1-100 μM)処置による細胞からの LDH 放出量について検討した。PGE₂ 処置細胞における LDH 放出量は、最大でも $5.3 \pm 0.8\%$ であった(Fig. 4C)。

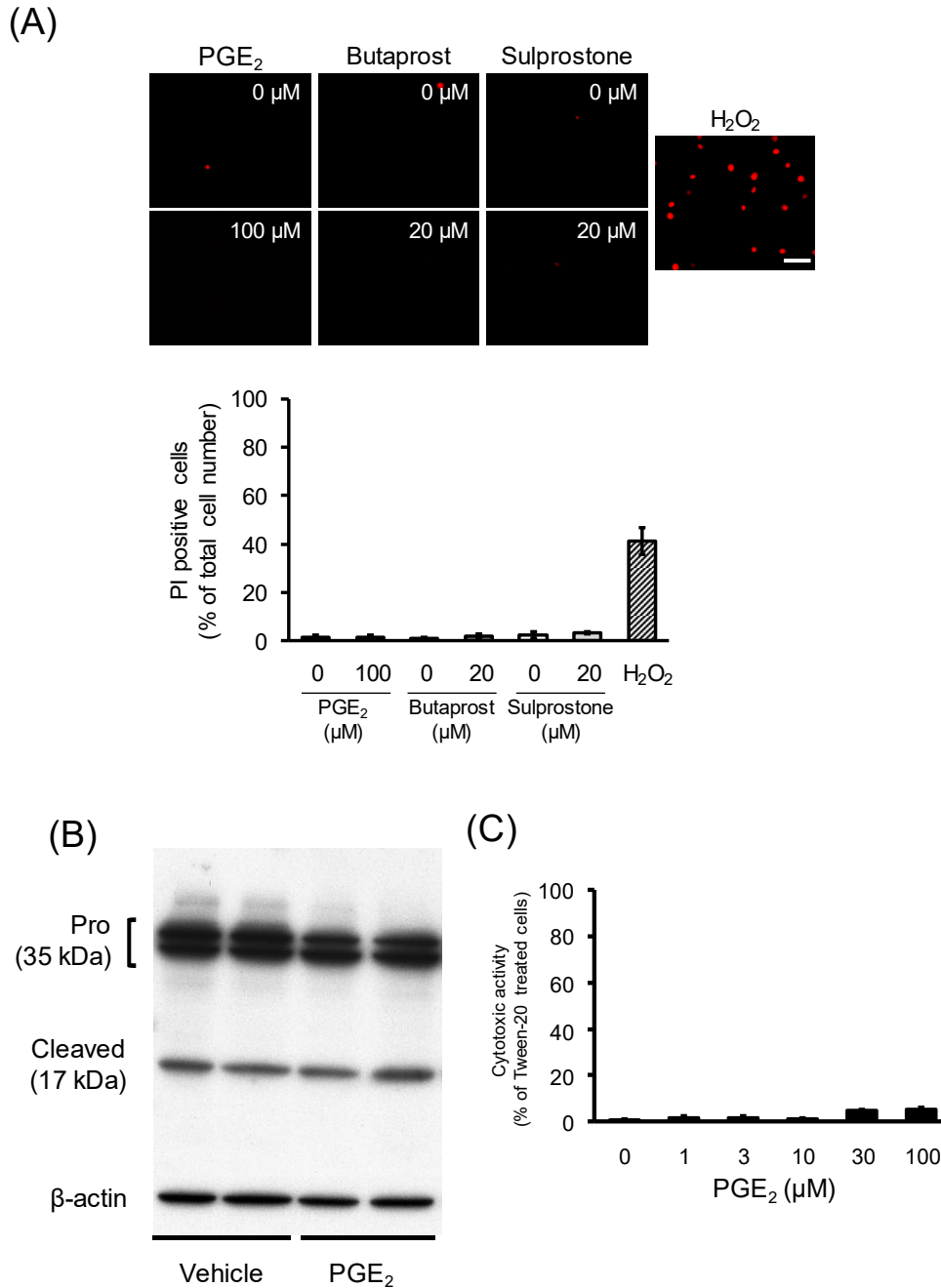


Fig. 4 Effects of PGE₂ and EP agonists on the viability of undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with PGE₂, butaprost (an EP2 agonist) or sulprostone (an EP1/EP3 agonist) for 48 h. (A) Representative fluorescence microscopy image of typical PI staining in each treatment group. A photograph of undifferentiated NSC-34 cells treated with 300 μM H₂O₂ for 4 h was also shown. Graphs show quantitative analysis of PI-positive cells, expressed as the ratio of PI-positive cells to 50 cells counted randomly using phase-contact microscopy. Each value represents the mean \pm S.E.M., n=4. Scale bar indicates 50 μm . (B) Photograph shows a representative result of Western blot with anti-caspase-3 antibody in control and 100 μM PGE₂-treated cells. (C) Effects of PGE₂ on LDH release in these cells. Values are calculated as the percentage of released LDH relative to cells treated with Tween-20 for 48 h. Each value represents the mean \pm S.E.M., n=3.

4. PGE₂ 及び EP 作動薬が神経突起伸長に及ぼす影響

NSC-34 において、PGE₂ 及び EP 作動薬が、ニューロン分化の形態学的指標である神経突起伸長に及ぼす影響について検討した(Fig. 5)。位相差顕微鏡観察による細胞の形態変化から、PGE₂ (1-100 μM) 48 時間処置により、神経突起の伸長が確認された(Fig. 5A)。各濃度における神経突起伸長細胞の割合は、PGE₂ の濃度依存的に増加し、100 μM で $71.0 \pm 4.5\%$ まで達した(Fig. 5B)。Butaprost (1-20 μM) 処置によっても、同様に神経突起の伸長が観察され(Fig. 5A)、その割合は濃度依存的に増加し、20 μM で $30.0 \pm 1.8\%$ であった(Fig. 5B)。一方で、sulprostone (1-20 μM) 処置では、20 μM においても形態学的な変化は観察されなかった(Fig. 5)。

次に、PGE₂ の神経突起伸長作用に EP 遮断薬が及ぼす影響を検討した(Fig. 6)。位相差顕微鏡の観察では、PGE₂ (100 μM) 単独で認められた神経突起伸長は、EP2 遮断薬である PF-04418948 (80 μM) の併用により抑制されたが、EP3 遮断薬である L-798,106 (60 μM) の併用では抑制されなかった(Fig. 6A)。なお、各遮断薬単独では、細胞形態に顕著な変化は認められなかった(Fig. 6A)。神経突起伸長細胞の割合を求めたところ、PGE₂ (100 μM) により $66.8 \pm 7.2\%$ まで増加した神経突起伸長細胞は、PF-04418948 (80 μM) の併用により $14.5 \pm 2.7\%$ まで有意に抑制されたが、L-798,106 (60 μM) の併用では、 $57.8 \pm 6.1\%$ で有意差は認められなかった(Fig. 6B)。

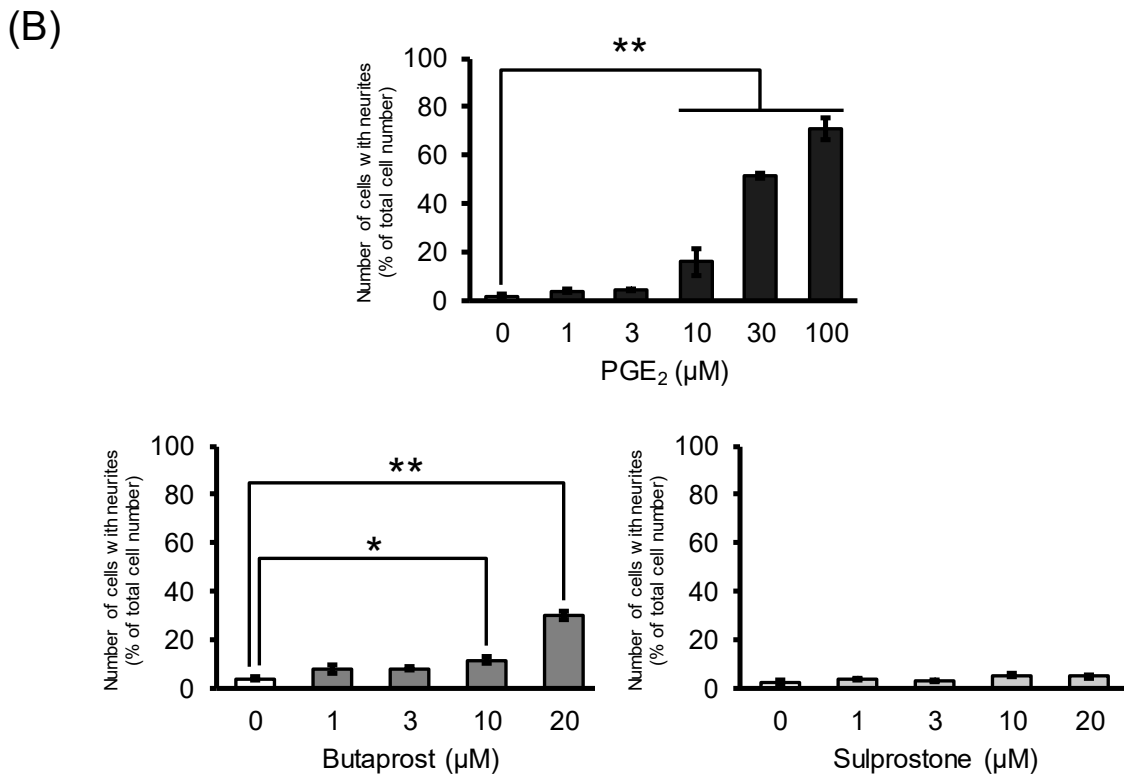
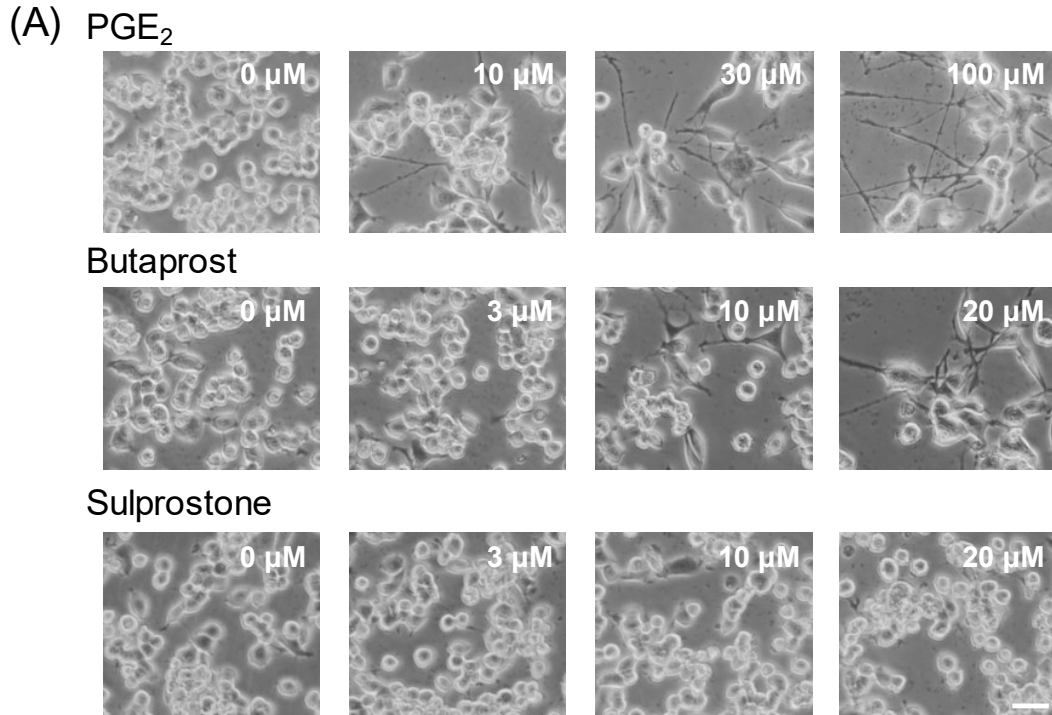


Fig. 5 Effect of PGE₂ and EP agonists on neurite outgrowth in undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with various concentrations of PGE₂, butaprost (an EP2 agonist) or sulprostone (an EP1/EP3 agonist) for 48 h. (A) Photographs show typical phase-contrast microscopy images of cells subjected to the different treatments. Scale bar indicates 50 μm. (B) Graphs show quantitative analysis of cells bearing neurite, which was expressed as the percentage of cells bearing neurites. Each value represents the mean ± S.E.M., n=4. *P<0.05, **P<0.01.

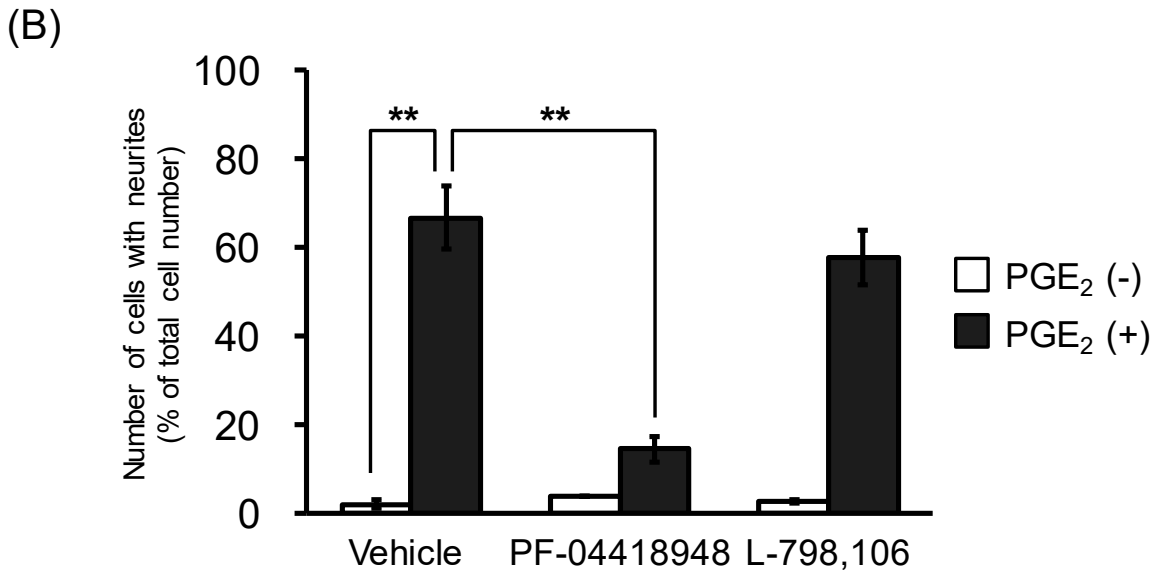
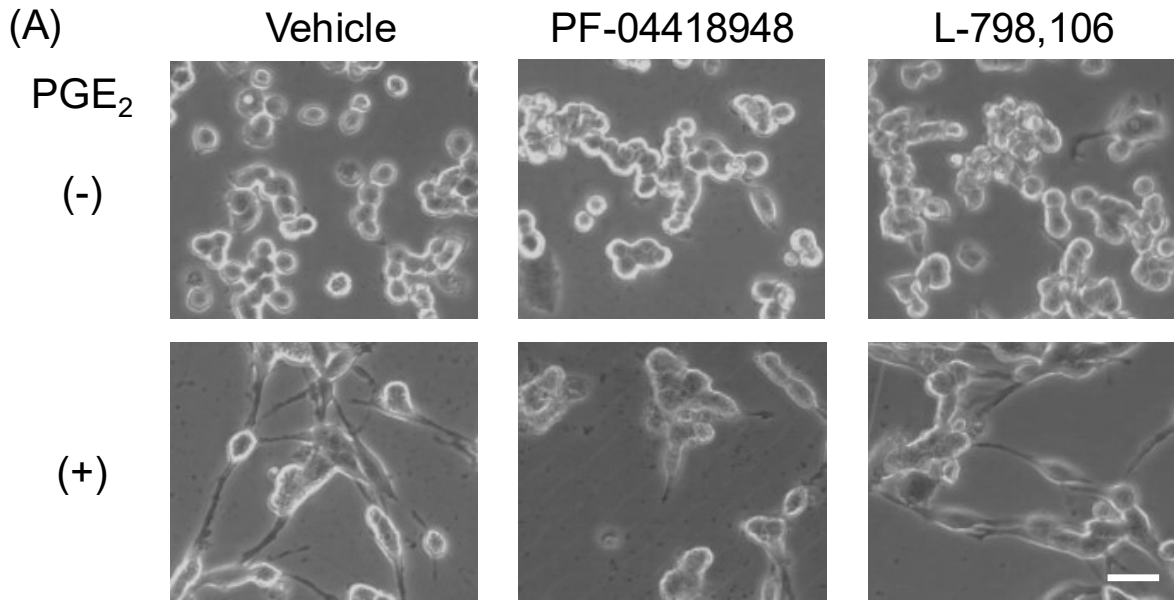


Fig. 6 Effect of EP antagonists on PGE₂-induced neurite outgrowth in undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with 80 μ M PF-04418948 (an EP₂ antagonist) or 60 μ M L-798,106 (an EP₃ antagonist) with or without 100 μ M PGE₂ for 48 h. (A) Photographs show typical phase-contrast microscopy images of cells treated with describing agents. Scale bar indicates 50 μ m. (B) Graphs show the rate of neurite-bearing cells. Each value represents the mean \pm S.E.M., n=3, **P<0.01.

5. 膜透過性 cAMP アナログが細胞増殖及び神経突起伸長に及ぼす影響

G_s タンパク質共役型受容体である EP2 は、活性化により細胞内 cAMP の上昇を引き起こす。そこで、膜透過性 cAMP アナログである dbcAMP が、NSC-34 の細胞増殖及び神経突起伸長に及ぼす影響について検討した(Fig. 7)。ラット由来の神経幹細胞及び神経前駆細胞からニューロンへの分化に用いられている 1 mM dbcAMP (50) で 48 時間処置した細胞の MTT 値は、 $94.1 \pm 3.6\%$ で、vehicle 処置細胞の MTT 値($100.0 \pm 4.9\%$)と同程度であった(Fig. 7A)が、位相差顕微鏡像において同一面積中の細胞数をカウントしたところ、vehicle 処置細胞では 701 ± 113 個であったのに対し、dbcAMP 処置細胞では 493 ± 87 個であり、dbcAMP 処置により有意な減少が認められた(Fig. 7B)。dbcAMP 処置細胞の PI 陽性細胞の割合は、 $2.3 \pm 0.5\%$ で、vehicle 処置細胞($2.0 \pm 0.4\%$)との間に差は認められなかった(Fig. 7C)。また、dbcAMP 処置により、突起伸長細胞が観察され(Fig. 7C)、その割合は、 $29.8 \pm 2.4\%$ で、vehicle 処置細胞($6.0 \pm 0.9\%$)と比較して、有意に増加した(Fig. 7D)。

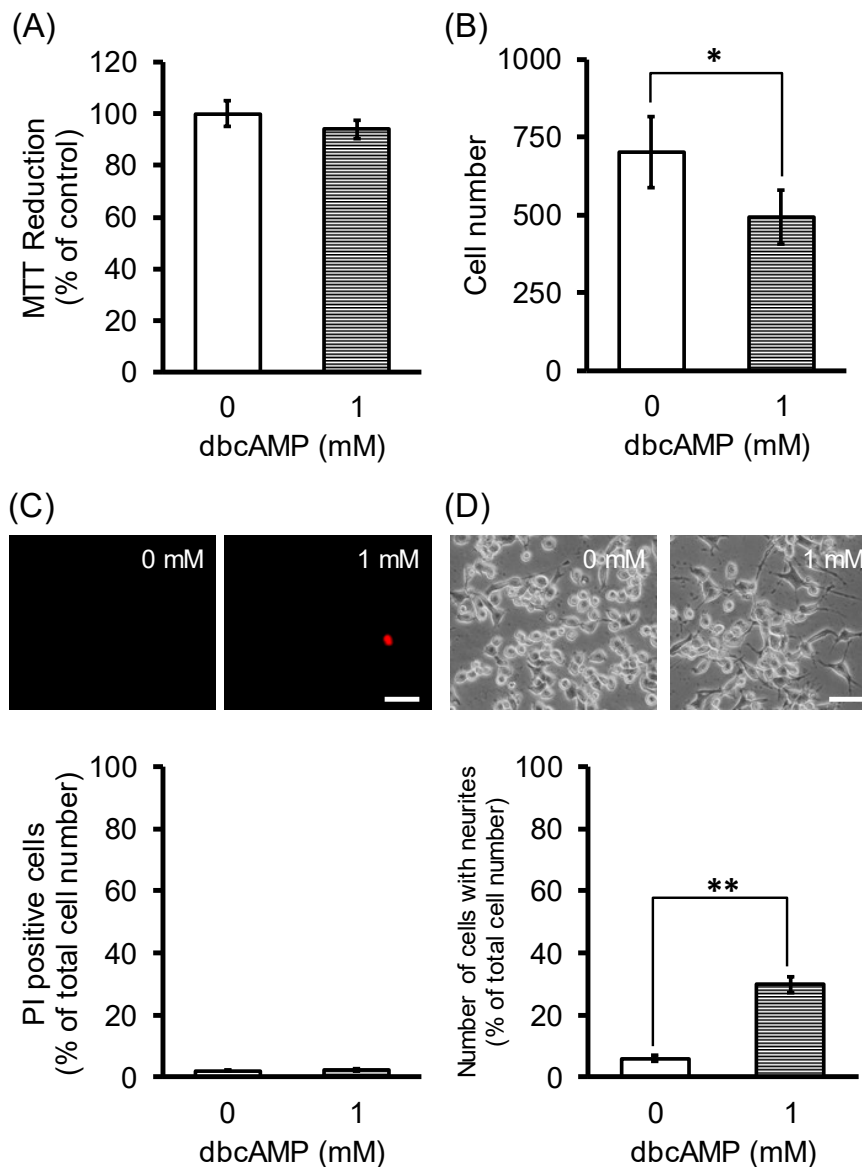


Fig. 7 Exogenously applied cAMP analog facilitates neurite outgrowth from undifferentiated NSC-34 cells without affecting cell proliferation. Undifferentiated NSC-34 cells were incubated with 1 mM dbcAMP for 48 h. (A) Graphs show the effect of dbcAMP on MTT reduction activity in these cells. Values are indicated as the proportion relative to non-treated cells. Each value represents the mean \pm S.E.M., $n=4$. (B) Graphs show the effect of dbcAMP on number of cells counted in phase-contrast images in these cells. Each value represents the mean \pm S.D., $n=4$. (C) Photographs show typical fluorescence microscopy images of PI staining cells following the treatment with dbcAMP. Graph shows quantitative analysis of PI-positive cells, expressed as the ratio of PI-positive cells to 50 cells counted randomly using phase-contrast microscopy. Each value represents the mean \pm S.E.M. Scale bar indicates 50 μ m. (D) Photographs show typical phase-contrast microscopy images following the treatment with dbcAMP. Graph shows the percentages of cells with neurites following the treatment with dbcAMP. Each value represents the mean \pm S.E.M., $n=4$. ** $P<0.01$. Scale bar indicates 50 μ m.

2-4 考察

細胞周期からの逸脱による細胞増殖の停止とそれに続く神経突起の伸長は、神経前駆細胞からニューロンへの分化において必要不可欠な段階である(51,52)。これまでに、PGE₂はEP1の活性化を介して、マウス由来ES細胞の増殖を促進することが報告されている(53)。しかし、PGE₂が神経前駆細胞の増殖に及ぼす影響については不明なままであった。本研究において、PGE₂処置は、MTT値を濃度依存的に減少させたが、細胞死の指標であるPI陽性細胞及びLDH放出量は増加させなかった。また、アポトーシス実行因子であるcleaved caspase-3タンパク質の発現増加も認められなかった。従って、PGE₂処置によるMTT値の減少は、細胞死によるものではなく、細胞増殖抑制の結果であることが明らかとなった。さらに、PGE₂は、細胞増殖を停止させただけでなく、濃度依存的に神経突起伸長細胞の割合を増加させた。以上より、PGE₂は、未分化の運動ニューロン前駆細胞様のNSC-34の細胞増殖を抑制し、それに続くニューロン様の形態変化を引き起こす分化誘導因子となることが明らかとなった。

これまでに、当研究室ではマウス脊髄運動ニューロン及びニューロン様に分化したNSC-34において、EP2及びEP3がタンパク質レベルで発現していることを報告している(31)。本研究では、未分化のNSC-34におけるEPの発現を検討し、マウス脊髄運動ニューロンやニューロン様に分化したNSC-34に一致して、EP2及びEP3が発現していることを明らかにした。そこで、PGE₂による細胞増殖抑制及び神経突起伸長作用が、EPを介するか否かを検討した。EP2作動薬であるbutaprostは、PGE₂と同様に濃度依存的に細胞増殖を減少させ、神経突起伸長細胞の割合を増加させた。これに対し、EP1/EP3作動薬であるsulprostoneは、EP3に対して選択性を示す濃度範囲(54)では細胞増殖や神経突起伸長に影響を及ぼさなかった。また、PGE₂による神経突起伸長細胞の増加は、EP2遮断薬であるPF-04418948の併用によって有意に抑制されたが、EP3遮断薬であるL-798,106の併用では抑制されなかった。以上より、PGE₂による細胞増殖抑制及び神経突起伸長作用は、主にEP2を介していることが明らかとなった。

Gsタンパク質共役型の受容体であるEP2は、刺激を受けるとACを活性化し、細胞内cAMPの上昇を引き起こす(27)。これまでに、dbcAMPが、ラット由来の神経幹細胞及び神経前駆細胞からニューロンへの分化を誘導することが報告されている(50)。また、細胞内cAMPの上昇は、脊髄損傷後の軸索再生に重要な役割を担うこと(55)、培養ラッ

ト運動ニューロンにおいて神経突起伸長を促進すること(56)が報告されている。このように、細胞内 cAMP の上昇は、ニューロンへの分化や神経突起伸長に対して重要な役割を果たすことが明らかになっている。本研究においても、ラット由来の神経幹細胞及び神経前駆細胞からニューロンへの分化に用いられている濃度である 1 mM dbcAMP (50)の処置は、MTT 値の低下は認められなかったものの、細胞数の増加を有意に抑制し、神経突起伸長細胞の割合を butaprost (20 μ M)と同程度まで増加させた。以上より、NSC-34 における PGE₂ の EP2 の活性化を介した細胞増殖抑制及び神経突起伸長作用には、細胞内 cAMP の上昇が関与することが示唆された。

PGE₂ は、EP2 の活性化を介して培養マウス脊髄後根神経節ニューロンの神経突起伸長を促進すること(44)、及び EP4 の活性化を介してラット感覚ニューロン様株化細胞 ND7/23 の神経突起伸長を促進すること(45)が報告されている。これらの細胞における PGE₂ による神経突起伸長作用は、dbcAMP によって完全に再現されるだけでなく、AC 阻害薬あるいは cAMP の下流にある protein kinase A に対する阻害薬を併用することで完全に消失すること(44,45)から、cAMP の上昇がその作用に中心的な役割を果たしていることが示唆されている。一方、NSC-34 における PGE₂ による神経突起伸長作用は、PF-04418948 の併用によりほぼ完全に抑制されたが、butaprost 及び dbcAMP によっては完全に再現されなかったことから、EP2 の活性化は神経突起伸長作用に中心的な役割を果たすものの、その作用を増強するような他の経路が存在する可能性が示唆される。PGE₂ は、protein kinase C や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 などの酵素タンパク質に直接結合することで、EP 非依存的にその活性を調節すること(57,58)が報告されており、EP 非依存的経路も含めた EP2 以外の分化誘導機構について今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本章をまとめると、PGE₂ は、運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 において、EP2 を刺激して、形態学的にニューロンへの分化を誘導することが明らかとなった。

2-5 小括

NSC-34 において、EP の発現、及び PGE₂ 及び関連化合物の影響を形態学的に検討し、以下の知見を得た。

1. EP2 及び EP3 の発現が認められたが、EP1 及び EP4 の発現は確認できなかった。
2. PGE₂ は、濃度依存的に細胞増殖を抑制し、神経突起を伸長させた。
3. EP2 作動薬である butaprost は、濃度依存的に細胞増殖を抑制し、神経突起を伸長させた。
4. EP1/EP3 作動薬である sulprostone は、至適濃度では、細胞の形態に影響を及ぼさなかった
5. PGE₂ による神経突起伸長細胞の割合の増加は、EP2 遮断薬である PF-04418948 の併用により抑制されたが、EP3 遮断薬である L-798,106 の併用では抑制されなかった。
6. 膜透過性 cAMP アナログである dbcAMP は、MTT 値には影響を及ぼさなかったが、細胞増殖を抑制し、神経突起を伸長させた。

以上より、PGE₂ は、EP2 を介して、未分化の NSC-34 の増殖を抑制し、神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。また、PGE₂ のニューロン分化促進作用には EP2 の活性化を介した細胞内 cAMP の上昇が少なくとも一部関与することが示唆された。

第三章

Prostaglandin E₂ により神経突起を伸長した NSC-34 の 運動ニューロン特性の評価

3-1 序論

ニューロンは、神経幹細胞から神経前駆細胞を経て分化・誘導される。運動ニューロンも同様に分化が進行し、運動ニューロン前駆細胞が RA をはじめとする様々なシグナル分子の影響を受け、細胞周期から逸脱し、軸索及び樹状突起を伸長することで、運動ニューロンへと分化する(Fig. 8)。分化した運動ニューロンは、活動電位の発生、acetylcholine (ACh)合成・放出能の獲得などの成熟過程を経て機能的な運動ニューロンへと成熟する(52)。

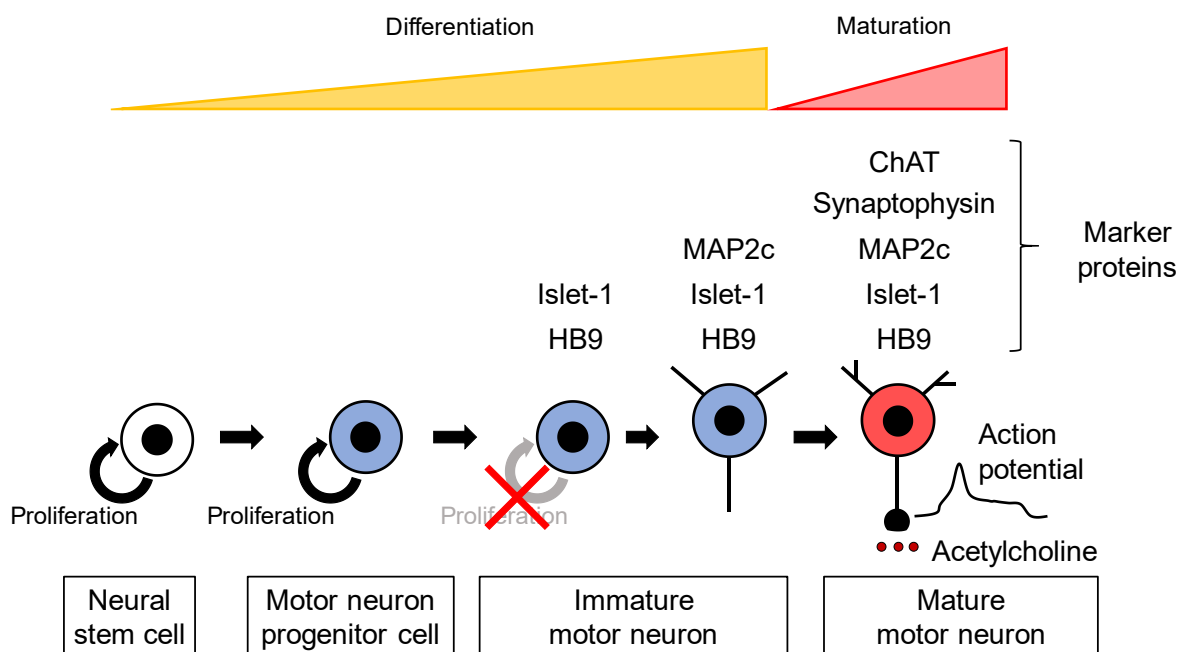


Fig. 8 Expression of marker proteins and acquisition of functions during motor neuron development.

現在までに、運動ニューロンの発生・分化に関与する複数の因子が同定され、その役割についても解明されている。運動ニューロン前駆細胞が細胞周期から逸脱すると、転写因子である HB9 及び Islet-1 の発現が上昇しはじめる(59)。これらの転写因子は、脊髄の他のニューロンへの分化誘導に関与するタンパク質の発現を抑制することで、運動ニューロン選択的な分化を進行させる(60,61)。HB9 や Islet-1 により分化が進行しはじめた運動ニューロンでは、微小管結合タンパク質 microtubule-associated protein 2c (MAP2c)の発現が上昇し、それにより軸索及び樹状突起の伸長が促進される(62)。また、HB9 及び Islet-1 は、その発現を維持し続けることで、ACh 合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT)などのコリン作動性機能に関連するタンパク質の発現誘導にも

関与し、運動ニューロンを機能的に成熟させる(63,64)。ChATにより合成されたAChは、運動ニューロンの軸索末端に存在する synaptophysin などの膜タンパク質により構成される小胞に輸送・蓄積され、運動ニューロンの神経活動に応じて放出される(4,65)。このように、運動ニューロンの発生には種々のタンパク質の段階的な発現上昇が関与することが明らかにされている。これらのタンパク質は運動ニューロンへの分化度及び成熟度の生化学的な指標として用いられる(66)。

ニューロンの電気生理学的特徴のひとつである活動電位は、刺激を受けることで生じる一過性の細胞膜の電位変化である。一般に、活動電位は、隣接する細胞膜上の電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav)を順次開口させることで生じる電位変化によって軸索上を伝播し、軸索の末端へと到達することでAChの放出に関与する(4)。そのため、活動電位の発生は、運動ニューロンの神経活動を反映するだけでなく、分化の進行度や成熟度を評価する電気生理学的な指標として用いられている(66)。

第二章に示したように、PGE₂ は、NSC-34 において、ニューロン様の形態変化である神経突起伸長を誘導することが明らかになった。しかし、PGE₂ により形態変化した NSC-34 の運動ニューロンとしての分化度及び成熟度は不明なままである。本章では、PGE₂ により神経突起を伸長した NSC-34 の運動ニューロンとしての分化度及び成熟度を明らかにするため、運動ニューロン特性を電気生理学的及び生化学的手法により検討し、RA 処置の場合と比較した。

3-2 実験方法

1. 使用試薬

PGE₂ は東京化成工業株式会社より、choline chloride 及び neostigmine methyl sulfate、adenosine 5'-triphosphate magnesium salt (Mg-ATP)、tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) は、Sigma Aldrich より、DMEM/F12 及び Minimum Essential Medium non-essential amino acid (MEM-NEAA) (100x)、Hoechst 33258 は Thermo Fischer Scientific より、RA 及び tetrodotoxin (TTX) は富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。その他の試薬は第二章に準じた。

2. 使用抗体

anti-MAP2 rabbit monoclonal antibody 及び anti-synaptophysin rabbit monoclonal antibody は Cell Signaling Technology より、anti-HB9 mouse monoclonal antibody は Santa Cruz Biotechnology より、anti-Islet-1 rabbit monoclonal antibody は Abcam より、anti-ChAT goat polyclonal antibody は Millipore より購入した。その他の抗体は第二章に準じた。

3. 細胞培養

継代培養は、第二章に準じた。神経突起は、培養プレート(IWAKI)または Poly-L-Lysine を予めコートしたディッシュ(Corning)に 5,000 cells/cm² で播種し、1 日培養した細胞に PGE₂ または RA を処置し、誘導した。PGE₂ 処置では、PGE₂ (30 μM) を添加した 10% FBS、100 units/mL penicillin、100 units/mL streptomycin を含む DMEM に、RA 処置では、RA (10 μM) を添加した 0.5% FBS、100 units/mL penicillin、100 units/mL streptomycin、1% MEM-NEAA を含む DMEM/F12 に全量交換した。その後は、2 ~ 3 日毎に同一培地に全量交換した。本研究における全ての実験には、5 ~ 15 代目の細胞を用いた。

4. 神経突起伸長の評価

第二章に準じて行った。位相差顕微鏡像は、IX70 (Olympus) に i-NTER LENS (マイクロナット株式会社) を装着し、iPod touch (Apple) によって撮影した。

5. 細胞障害性の評価

細胞障害性は、Hoechst 33258/PI 染色及び LDH 法により評価した。

(1) Hoechst 33258/PI 染色

試薬処置終了 30 分前に Hoechst 33258 (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び PI (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加した。プレート内の培地を新鮮な培地に交換し、倒立型蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus)を用いて撮影した。細胞傷害率は、Hoechst 33258 陽性細胞に対する PI 陽性細胞の割合で示した。

(2) LDH 法

第二章に準じて行った。

7. Whole-cell patch-clamp 法

Whole-cell patch-clamp 法は、Shiozaki らの方法に準じて行った(67)。試薬処置終了後、培地を人工脳脊髄液(aCSF:artificial cerebrospinal fluid) (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 12 mM NaHCO_3 , pH 7.4)に交換した。また、 Na^+ を除去した aCSF は、NaCl を等量の TEA-Cl に置換し、 NaHCO_3 を除去することで作成した。ガラス電極(5–9 $\text{M}\Omega$)は、DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instruments)を用いて作成し、内部を人工細胞内液(150 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, pH 7.2)で満たした。ガラス電極の細胞へのアプローチは、位相差顕微鏡 (IX71, Olympus)観察下で行った。得られた電気信号は、電位固定条件下では L/M-EPC-7+ patch-clamp amplifier (Heka Elektronik)、電流固定条件下では Axopatch-1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments)を用いて増幅し、DigiData 1440A analog-to-digital interface (Molecular Device)を介して 10 kHz でフィルターした後、pCLAMP ソフトウェア(Axon Instruments)でモニター、記録、解析を行った。全ての記録は、 30°C で行った。Fig. 9 に whole-cell patch-clamp 法の模式図及び記録中の位相差顕微鏡像を示した。

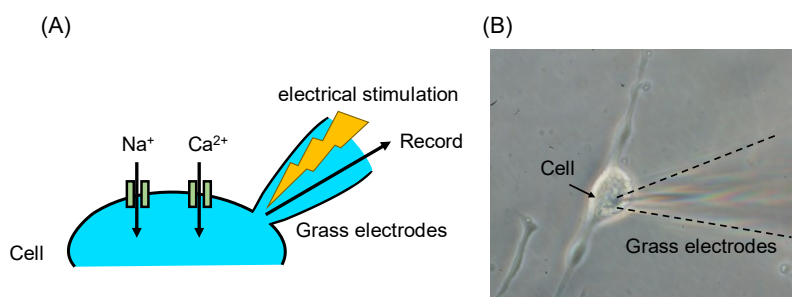


Fig. 9 Diagram (A) and phase-contact microscopy image (B) of whole-cell patch-clamp technique.

8. Western blot 法

第二章に準じて行った。5% skim milk を含む TTBS で blocking されたメンブレンを anti-MAP2 rabbit monoclonal antibody (1:1000)、anti-synaptophysin rabbit monoclonal antibody (1:1000)、anti-Islet-1 rabbit monoclonal antibody (1:1000)、anti-HB9 mouse monoclonal antibody (1:500)及び anti-ChAT goat polyclonal antibody (1:500)で一晩反応させた。翌日、TTBS で洗浄し、anti-rabbit-IgG-HRP (1:20000)または anti-mouse-IgG-HRP (1:40000)と室温で 1 時間反応させ、ECL により発光させた。その後、anti- β -actin mouse monoclonal antibody (1:2000)と室温で 1 時間、次に anti-mouse-IgG-HRP (1:40000)と室温で 1 時間反応させ、ECL により発光させた。得られたバンドは、Scion Image (Scion corporation)を用いて解析した。

9. ACh の放出及び定量

培養液中へ放出された ACh の回収は、Auld らの方法(68)に準じて行い、その定量は Kiguchi らの方法(69)に準じて行った。具体的には、試薬処置終了後、細胞に choline を取り込ませるため、培地を 10 μ M choline chloride 及び 100 nM neostigmine methyl sulfate を含む aCSF (500 μ L)に交換し、37°C、5%CO₂ 条件下でインキュベートした。60 分後、半量を新しい同溶液と交換し、再び 10 分間インキュベートした。シャーレ内の溶液 100 μ L を回収し、4°C、10,000 x g で 10 分間遠心分離した後、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、サンプルとした。サンプルは、液体窒素によって直ちに凍結し、-80°C で保存した。サンプルは、内標準物質である isopropyl homocholine (IPHC)と等量混合し、HPLC system (HTEC-500, Eicom)へ注入した。サンプル中の ACh は、carbonate buffer (50 mM KHCO₃, 1.1 mM decanesulfonic acid、0.13 mM ethylenediaminetetraacetic acid、pH 8.2)を移動相とし、流速 150 μ L/min で、Eicompak AC-GEL column (2.0 ID x 150 mm, Eicom)を用いた逆相クロマトグラフィーにより分離した。次いで、acetylcholinesterase 及び choline oxidase を含む酵素カラム (AC-ENZYME II, 1.0 ID x 4 mm, Eicom)を用いて、ACh から過酸化水素を生成させた。生成した過酸化水素は、Ag/AgCl を参考電極とし、白金電極に印加電圧+450 mV を加えることにより生じる電子移動による電流を電気化学的に検出し、定量した。分離カラム及び酵素カラムは、33°C で用いた。サンプル中の ACh 量は、標準液中の ACh (250 fmol)及び IPHC

(250 fmol)の面積と比較して算出した後、血球計でカウントした細胞数によって標準化した。

10. 統計学的処理

値は、平均値±標準偏差または平均値±標準誤差で示した。有意差検定には、2 群では Student's *t*-test を、3 群以上では one-way ANOVA の後 Tukey's test を用いた。

3-3 結果

1. PGE₂ 及び RA による神経突起伸長細胞の経時変化

PGE₂による形態学的な分化誘導作用を、これまで使用されている RA による作用と比較した(Fig. 10)。位相差顕微鏡像では、PGE₂ (30 μM)処置 3 日後までは細胞の増加は認められず、1 日後から神経突起伸長細胞の出現が認められた(Fig. 10A)。また、PGE₂ (30 μM)処置 7 日後には、細胞死が誘導され、細胞のプレート底面からの剥離が観察された(Fig. 10A)。そこで、神経突起伸長細胞の割合を定量したところ、PGE₂ 処置 2 日後をピークとした増加が認められた(59.8 ± 1.8%, Fig. 10B)。RA (10 μM)処置群においても、処置 1 日後から形態変化が認められたが、PGE₂ 処置群とは異なり、処置 7 日後においても細胞のプレート底面からの剥離は観察されず、細胞の増加も認められなかった(Fig. 10A)。また、RA 処置群でも神経突起伸長細胞の割合は時間依存的に増加したが、処置 2 日後の神経突起伸長細胞の割合は 34.6 ± 1.1%に留まり、PGE₂ の 2 日処置群(59.8 ± 1.8%)と同程度の割合になるまでに 7 日間を要した(55.5 ± 3.5%, Fig. 10B)。一方、vehicle 処置群では、位相差顕微鏡での観察において、処置 7 日後まで、細胞はプレート底面に接着したまま時間依存的に増加したが、形態の変化は認められず、殆どの細胞が円形を保ち、神経突起も認められなかった(Fig. 10B)。

神経突起伸長細胞の割合が同程度であった PGE₂ 処置 2 日後及び RA 処置 7 日後の細胞死について LDH 法及び PI 染色により検討した(Fig. 11)。PGE₂ 処置 2 日後の細胞の LDH 放出量は 0.7 ± 0.3% (Fig. 11A)、Hoechst 33258 陽性細胞(全細胞)に対する PI 陽性細胞(死細胞)の割合は 0.6 ± 0.3% (Fig. 11B)であり、両試験において、細胞死は認められなかった。また、RA 処置 7 日後における LDH 放出量は 5.1 ± 0.8% (Fig. 11A)を、PI 陽性細胞の割合は 0.9 ± 0.4% (Fig. 11B)を示し、LDH 放出量は、PGE₂ 処置細胞と比較して、増加する傾向を示したものの、その変化は有意なものではなかった。

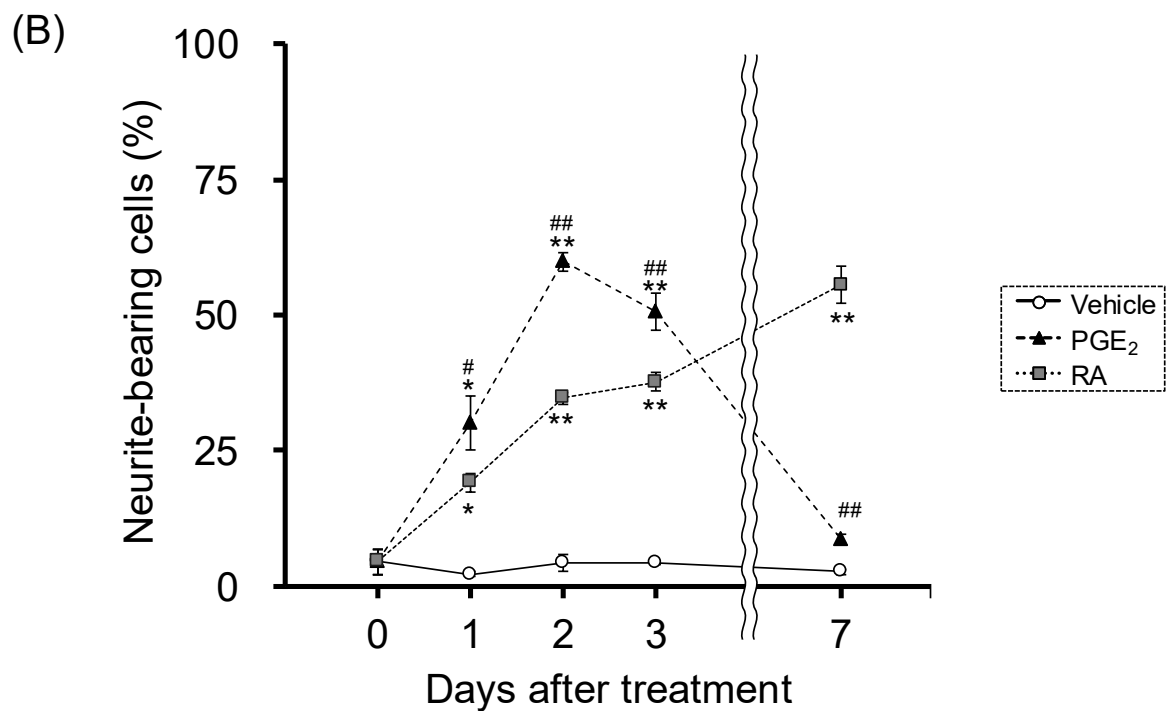
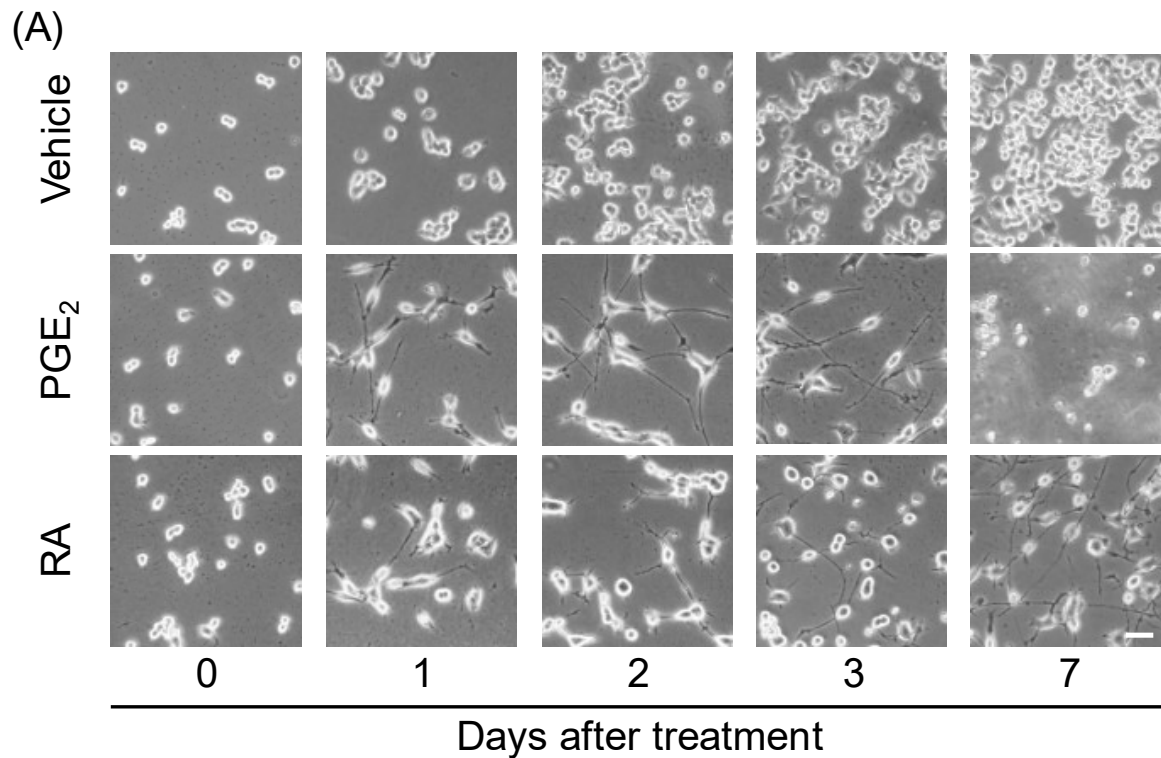


Fig. 10 Effects of PGE₂ and RA on neurite outgrowth in undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH), 30 μ M PGE₂ or 10 μ M RA. (A) Photographs show typical phase-contrast microscopy image in each treatment group. Scale bar indicates 50 μ m. (B) Graph shows quantitative analysis of cells bearing neurite, which was expressed as the percentage of cells bearing neurites. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle-treated cells at same days. #p<0.05, ##p<0.01 vs. RA-treated cells at same days.

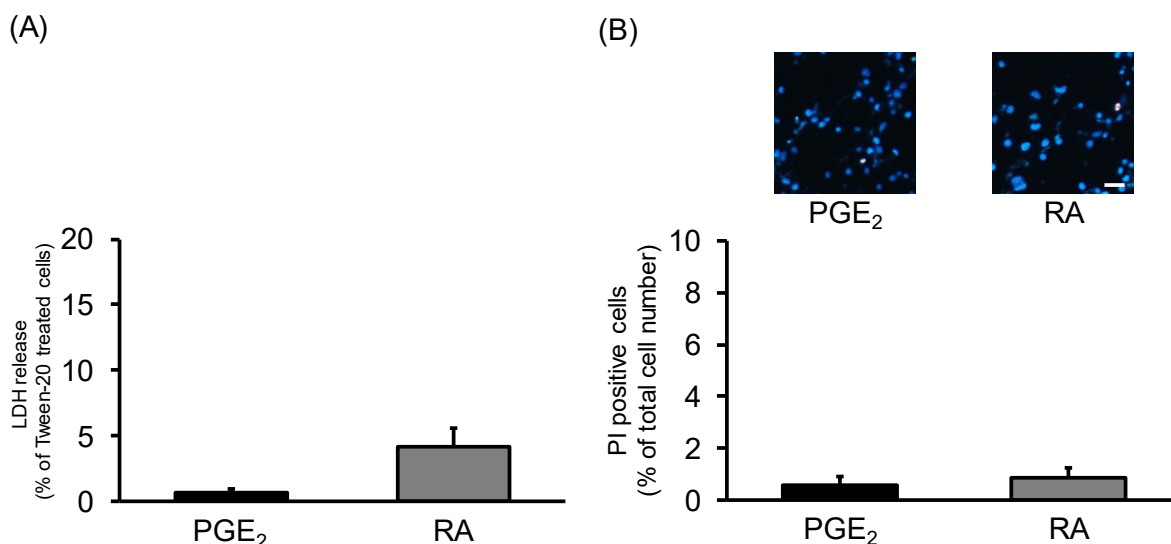


Fig. 11 Effects of PGE₂ and RA on the viability in undifferentiated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with 30 μ M PGE₂ for 2 days or 10 μ M RA for 7 days. (A) Graph shows the percentage of released LDH relative to cells treated with Tween-20. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=4). (B) Photographs show representative fluorescence microscopy images of Hoechst 33258/PI double staining in each treatment group. Scale bar indicates 50 μ m. Graph shows quantitative analysis of PI-positive cells, expressed as the ratio of PI-positive cells to Hoechst 33258-positive cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=4).

2. PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞における活動電位の変化

PGE₂ または RA 処置によりニューロン様に形態変化した NSC-34 の電気生理学的な特徴を明らかにするため、神経突起伸長細胞の割合が同程度であった 2 日間の PGE₂ 処置細胞、7 日間の RA 処置細胞、及び 2 日間の vehicle 処置細胞における活動電位の有無を whole-cell patch-clamp 法により比較検討した(Fig. 12)。150 ms の持続時間で 100 pA ずつ上昇する脱分極電流パルスを加えたところ、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞では、いずれも典型的な活動電位の波形が記録されたが、vehicle 処置細胞においては、活動電位の発生は認められなかった(Fig. 12A)。また、初めて活動電位を発生させるのに必要な刺激電流(閾値電流)は、PGE₂ 処置細胞では平均 262.5 ± 55.4 pA で、RA 処置細胞の平均 525.0 ± 92.4 pA に対し、有意な低下が認められた(Fig. 12B)。PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞において、閾値電流によって記録された活動電位の波形について、閾値電位、ピーク電位及び振幅を解析した。PGE₂ 処置細胞の閾値電位は -28.6 ± 3.6 mV (Fig. 12C)、ピーク電位は 14.2 ± 4.5 mV (Fig. 12D)、波形の振幅は 44.7 ± 0.8 mV (Fig. 12E)であったのに対し、RA 処置細胞の閾値電位は -32.9 ± 5.9 mV (Fig. 12C)、ピーク電位は 12.8 ± 6.4 mV (Fig. 12D)、波形の振幅は 41.7 ± 6.9 mV (Fig. 12E)

であり、これらの値に有意な差は認められなかった。

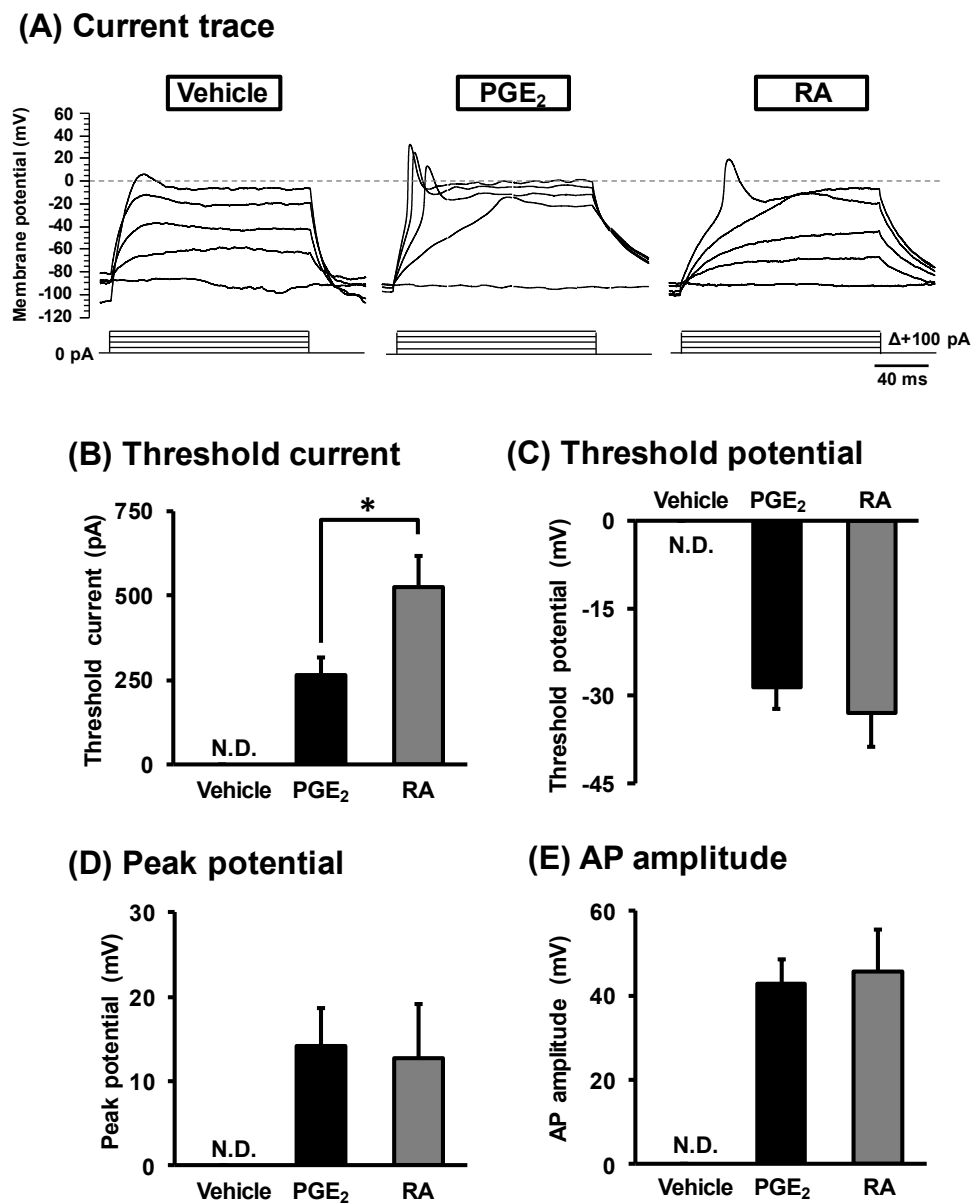


Fig. 12 Generation of action potential in PGE₂- and RA-treated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μ M PGE₂ for 2 days or 10 μ M RA for 7 days. (A) Images show representative action potential traces recorded by depolarization current pulses of 150 ms in 100 pA steps from a holding potential of 0 pA in each treatment group. Graphs show threshold current (B), threshold potential (C), action potential peak potential (D) and action potential amplitude (E) in each treatment group. Each value represents the mean \pm S.D. (vehicle n=14, PGE₂ n=16, RA n=12). *P < 0.05. N.D. means not detected.

3. PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞における電位依存性イオン電流の変化

活動電位の発生には、細胞膜上の電位依存性イオンチャネルを介したイオン流入によって生じるイオン電流の増大が重要である(70)。そこで、活動電位の発生が認められた PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞における電位依存性イオンチャネル由来のイオン電流の特徴を、whole-cell patch-clamp 法により検討した(Fig. 13)。保持電位を-80 mV とし、-100 ~ +80 mV を+10 mV ずつ上昇するステップ状の脱分極電位パルスを加えると、vehicle 処置細胞、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞のいずれの細胞においても、電位依存性イオンチャネルを介した細胞内へのイオン流入を示す内向き電流が記録された(Fig. 13A)。ホールセル状態を形成した際に記録された細胞膜の電気容量である膜容量は、それぞれ vehicle 処置細胞では平均 1.81 ± 0.1 pF、PGE₂ 処置細胞では平均 3.4 ± 0.2 pF、RA 処置細胞では平均 3.1 ± 0.5 pF であった(Fig. 13C)。そこで、これらの細胞の膜容量で内向き電流の値を標準化した結果、PGE₂ 処置細胞のピーク電流密度は、 494.8 ± 84.2 pA/pF となり、vehicle 処置細胞の 224.0 ± 42.9 pA/pF と比較して、有意な増大が認められた(Fig. 13B)。また、RA 処置細胞のピーク電流密度は、 393.6 ± 85.4 pA/pF であり、vehicle 処置細胞より増加したが、有意差は認められなかった(Fig. 13B)。

次に、ニューロンにおける電位依存性イオン電流の発生と活動電位の発生及び伝播に最も重要な Factor である Nav (70,71)の関与について検討した(Fig. 14)。保持電位を-80 mV とし、-100 ~ +100 mV を+2 mV ずつ徐々に上昇するスロープ状の脱分極電位パルスを加えたところ、vehicle 処置細胞、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞のいずれの細胞でも内向き電流が記録された(Fig. 14)。そこで、脱分極電位パルスを繰り返し加え続け、内向き電流を連続記録している状態で、還流液を Na⁺を除去した aCSF に変化させたところ、いずれの細胞においても、内向き電流の完全な消失が認められた(Fig. 14A)。また、Nav 遮断薬である TTX (1 μM)を含む aCSF で還流した場合も、全ての細胞において、内向き電流の発生は、完全に消失した(Fig. 14B)。

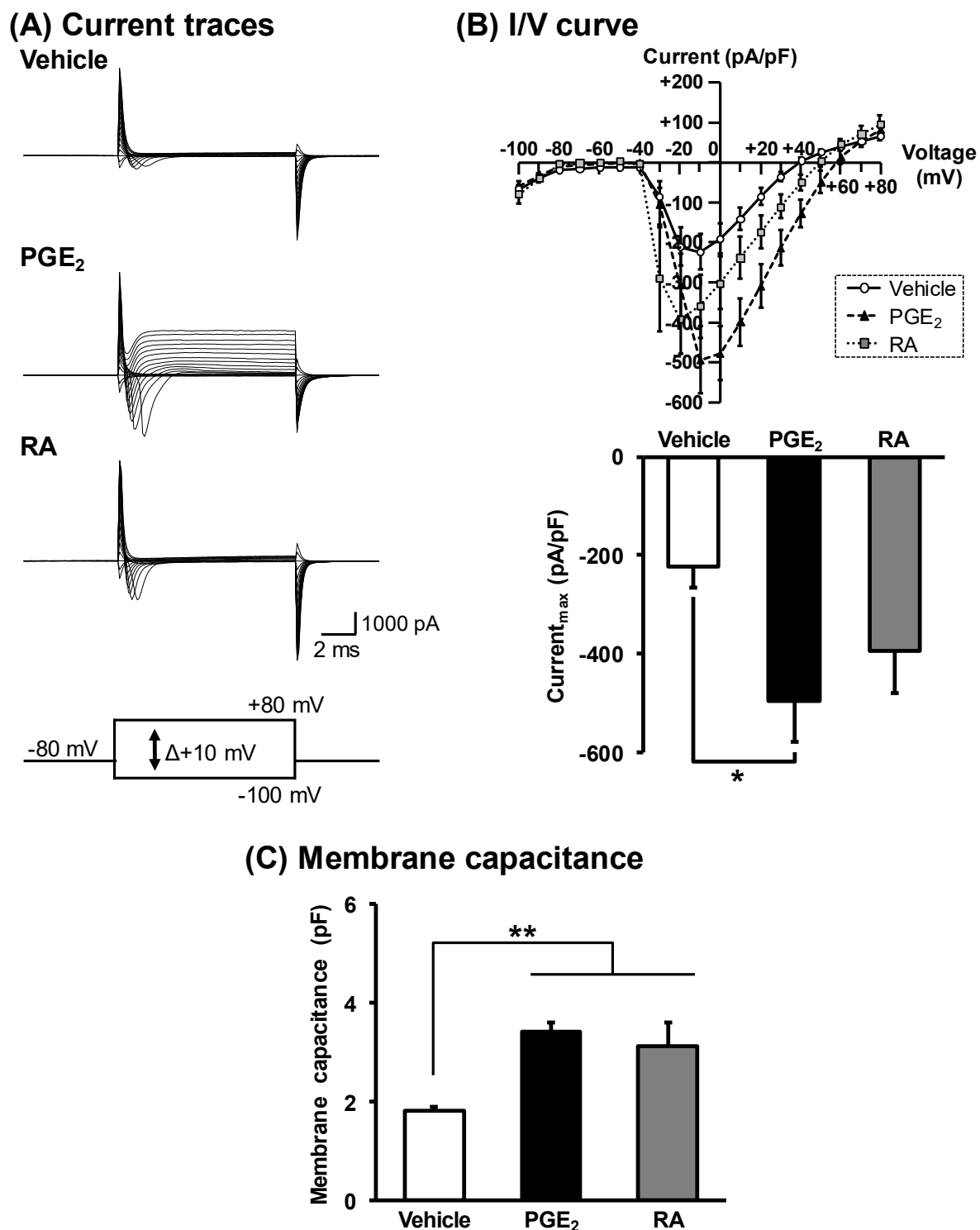


Fig. 13 Increase in inward currents in PGE₂- and RA-treated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μ M PGE₂ for 2 days or 10 μ M RA for 7 days. (A) Representative inward current traces recorded by depolarization voltage pulses from -100 mV to $+80$ mV in 10 mV steps from a holding potential of -80 mV in each treatment group. (B) Upper graph shows current-voltage curve recorded by depolarization pulses in each treatment group. Lower graph shows the peak current densities of each treatment group. (C) Graph shows membrane electrical capacitance in each treatment group. Each value represents the mean \pm S.D. (n=18). *P < 0.05. **P < 0.01.

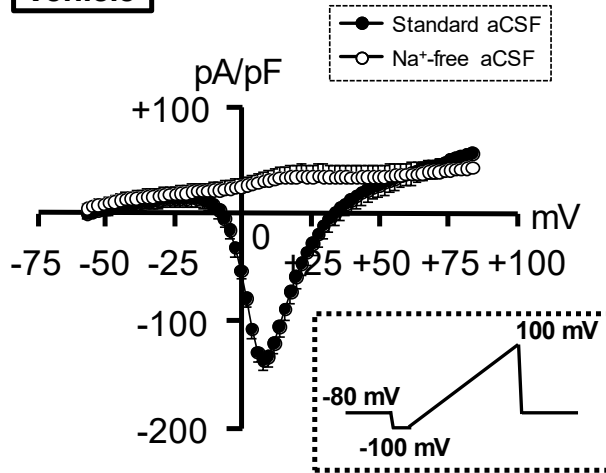
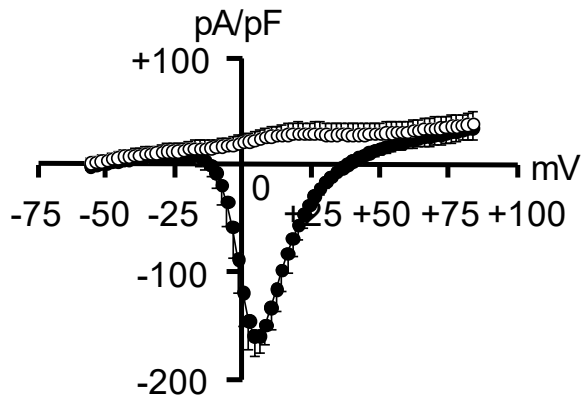
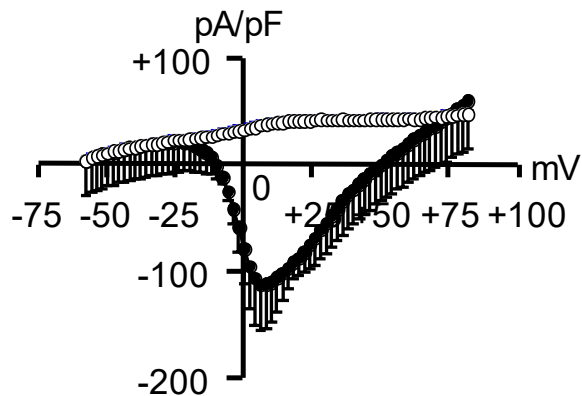
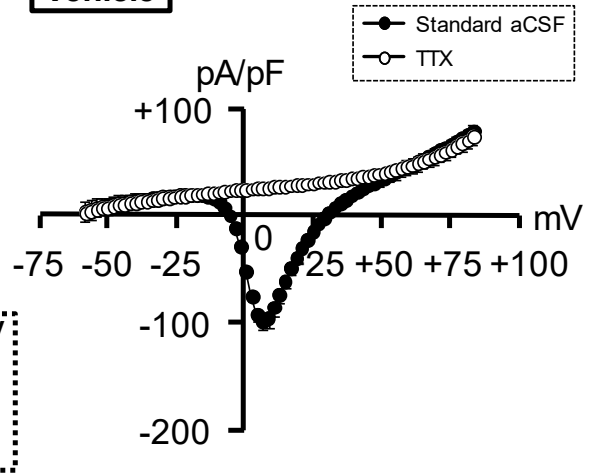
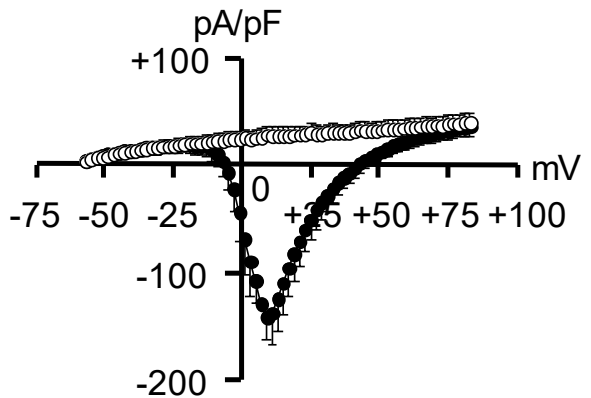
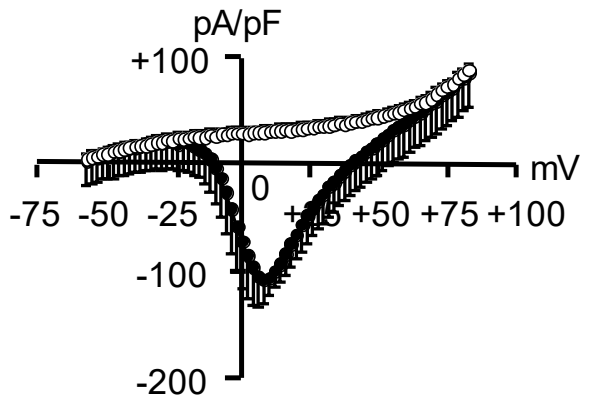
(A) Na⁺-free ECS**Vehicle****PGE2****RA****(B) TTX****Vehicle****PGE2****RA**

Fig. 14 Effect of Na⁺-free aCSF or TTX perfusion on voltage-dependent inward current. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μ M PGE₂ for 2 days or 10 μ M RA for 7 days. Ramp current were recorded by depolarization voltage pulses of 100 ms from -100 mV to +100 mV (insert panel). Baseline subtracted by fitting the linear portion between -100 mV and -60 mV to zero. Graphs show current-voltage curve with or without Na⁺-free aCSF (A) and 1 μ M TTX (B) in each treatment group. Each value represents the mean \pm S.D. (n=18).

4. PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞における神経分化マーカーのタンパク質発現変化

ニューロンの分化マーカーで、分化の初期段階から発現が増加する微小管タンパク質 MAP2c 及び、成熟段階から発現が増加するシナプス小胞膜タンパク質 synaptophysin のタンパク質発現を western blot 法により検討した。MAP2c の発現レベルは、vehicle 処置細胞を 100%とすると、PGE₂ 処置細胞では $184.9 \pm 26.5\%$ 、RA 処置細胞では $185.2 \pm 0.9\%$ となり、PGE₂ 処置及び RA 処置により有意に増加したが、PGE₂ 処置及び RA 処置による差は認められなかった(Fig. 15A)。また、synaptophysin の発現レベルも、PGE₂ 処置細胞では $171.9 \pm 6.1\%$ 、RA 処置細胞では $206.7 \pm 46.7\%$ となり、PGE₂ 処置または RA 処置により有意に増加したが、両処置間に有意な差は認められなかった(Fig. 15B)。次に、運動ニューロン特異的マーカータンパク質について、運動ニューロン選択的な分化誘導及び成熟に関与する転写因子である HB9 及び Islet-1 の発現を検討した。その結果、HB9 の発現レベルは、PGE₂ 処置細胞で $338.7 \pm 39.6\%$ 、RA 処置細胞で $328.4 \pm 73.6\%$ (Fig. 15C)、Islet-1 は、PGE₂ 処置細胞で $140.5 \pm 8.3\%$ 、RA 処置細胞で $164.9 \pm 14.6\%$ となり(Fig. 15D)、MAP2c 及び synaptophysin の場合と同様に、PGE₂ 処置または RA 処置による有意な増加が認められたが、両処置間に有意な差は認められなかった。一方、運動ニューロンの成熟段階から発現が増加する ACh 合成酵素 ChAT のタンパク質発現レベルは、PGE₂ 処置細胞で $202.7 \pm 26.4\%$ 、RA 処置細胞で $145.6 \pm 6.1\%$ と、両処置ともに vehicle 処置より有意に増加したが(Fig. 16)、ChAT は、上記の 4 タンパク質とは異なり、PGE₂ 処置細胞の発現レベルが RA 処置細胞と比較しても有意に高かった(Fig. 16)。

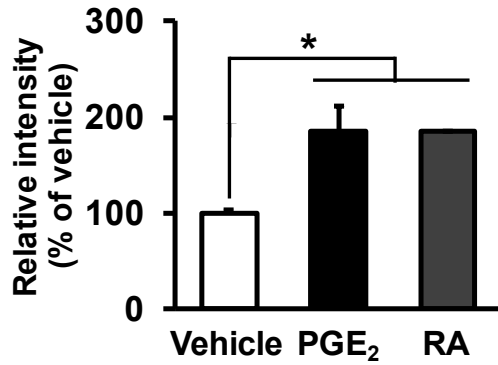
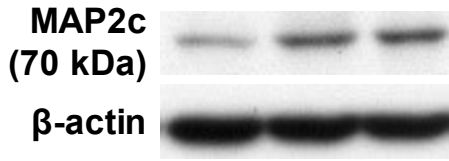
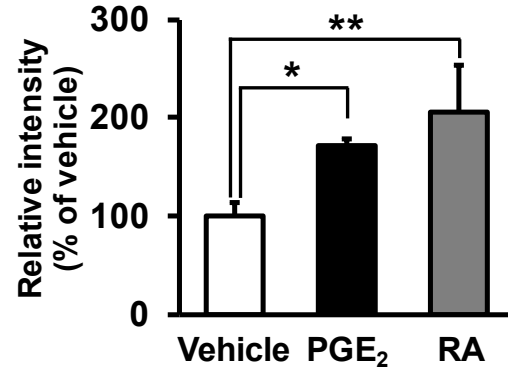
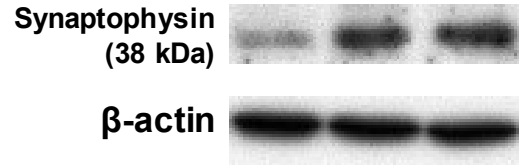
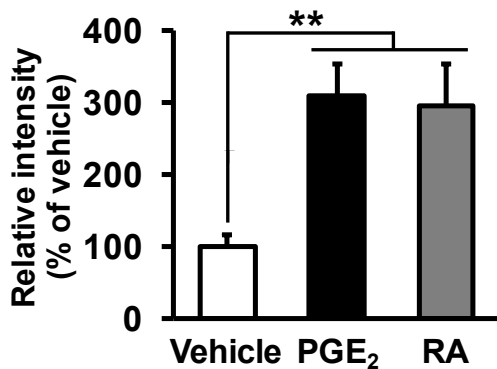
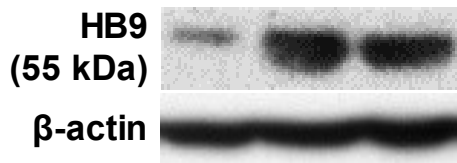
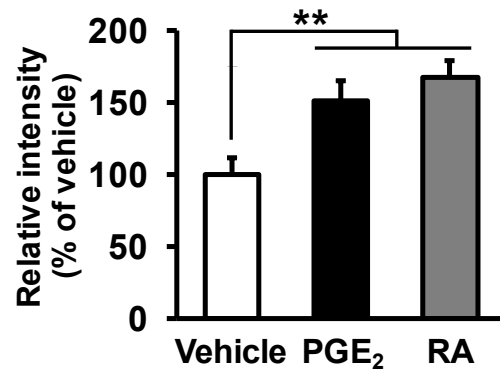
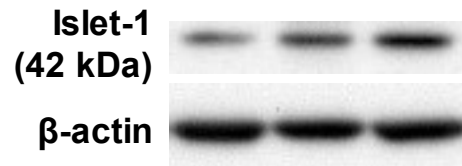
(A) MAP2c**(B) Synaptophysin****(C) HB9****(D) Islet-1**

Fig. 15 Expression of differentiation markers in PGE₂- and RA-treated NSC-34 cells Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μ M PGE₂ for 2 days or 10 μ M RA for 7 days. Photographs show representative results of western blot of MAP2c (A), synaptophysin (B), HB9 (C) and Islet-1 (D) with β -actin as an internal marker. Graphs show the relative densities of bands on the blots estimated quantitatively using Scion imaging software. Each value represents the mean \pm S.D. (n=6). *P < 0.05, **P < 0.01.

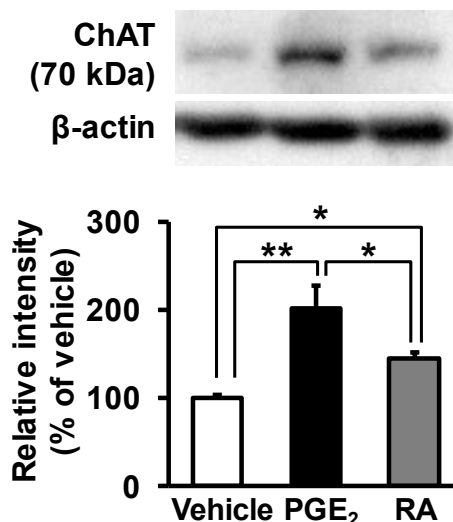
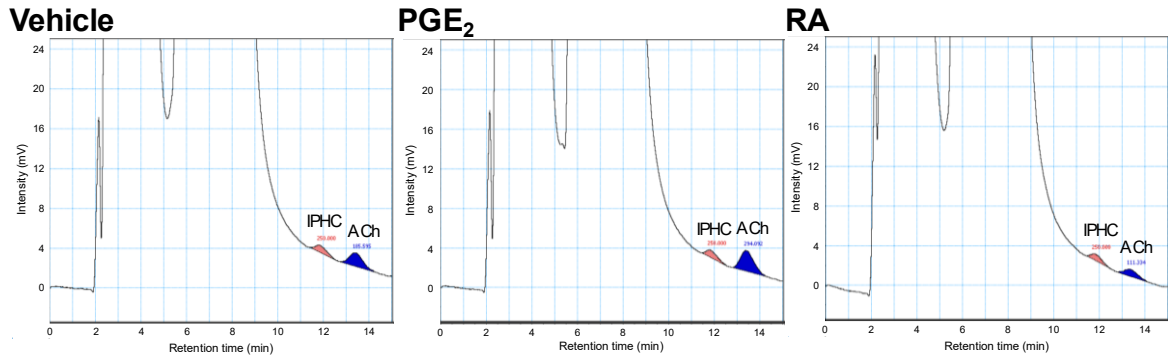


Fig. 16 Expression of ChAT in PGE₂- and RA-treated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μM PGE₂ for 2 days or 10 μM RA for 7 days. Photograph shows a representative result of western blot of ChAT with β-actin as an internal marker. Graph shows the relative densities of bands on the blots estimated quantitatively using Scion imaging software. Each value represents the mean ± S.D. (n=6). *P < 0.05, **P < 0.01.

5. PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞における ACh 放出能の検討

成熟運動ニューロンの機能である ACh の放出能について明らかにするため、培養液中への ACh 放出量を HPLC 法により測定した。Fig. 17A に示したように、各処置細胞の培養液から調製したサンプル中の全てで保持時間約 11.80 min に内標準物質である IPHC に由来するピークが、保持時間約 13.30 min に ACh に由来するピークが検出された。ACh 標準液を用いて測定した IPHC と ACh の面積比との比較から各処置細胞の培養液中の ACh 量を算出し、各々の試料中の細胞数で標準化した値を ACh 放出量とした。PGE₂ 処置細胞からの ACh 放出量は 45.4 ± 20.4 fmol/ 1.0×10^4 cells で、vehicle 処置細胞の 16.8 ± 2.7 fmol/ 1.0×10^4 cells 及び RA 処置細胞の 3.13 ± 3.0 fmol/ 1.0×10^4 cells と比較して、有意に増加した(Fig. 17B)。RA 処置細胞からの ACh 放出量は、vehicle 処置細胞より低値であったが、両処置間に有意差は認められなかった(Fig. 17B)。

(A) HPLC chromatograms



(B) ACh release

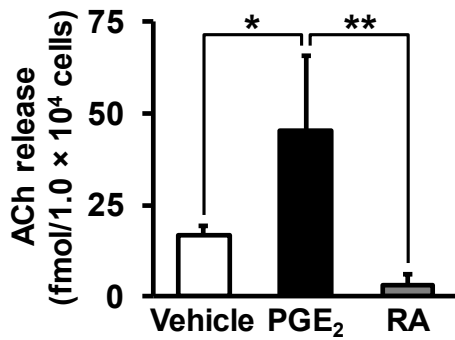


Fig. 17 Release of ACh in PGE₂- and RA-treated NSC-34 cells. Undifferentiated NSC-34 cells were treated with vehicle (EtOH) for 2 days, 30 μM PGE₂ for 2 days or 10 μM RA for 7 days. (A) Representative HPLC chromatograms (Red: IPHC, Blue: ACh) of each treatment group. (B) Graph shows the ACh concentration normalized per 1.0 × 10⁴ cells in each treatment group. Each value represents the mean ± S.D. (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01.

3-4 考察

RA は、運動ニューロンの発生に必須なシグナル分子であり(72)、iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導因子としても汎用されている(7,73)。また、RA は、細胞増殖能を持つ運動ニューロン前駆細胞様の NSC-34 においても、増殖を抑制し、神経突起伸長を促進し、運動ニューロン様の細胞へと分化させることが報告されている (12,13,74)。これらの報告と一致して、本研究でも未分化の NSC-34 に RA を処置することにより、細胞増殖抑制と時間依存的な神経突起伸長作用が確認された。そこで、RA による神経突起伸長作用と第二章で明らかとなった PGE₂ による神経突起伸長作用を経時的に比較したところ、2 日間の処置で、PGE₂ は、神経突起伸長細胞が $59.8 \pm 1.8\%$ になったのに対し、RA は $34.6 \pm 1.1\%$ であった。また、RA 処置 7 日後の神経突起伸長細胞の割合は、PGE₂ の 2 日処置と同程度であった。この時、両処置細胞において細胞死の誘導は認められなかった。以上より、PGE₂ は、RA よりも迅速に NSC-34 をニューロン様の形態にさせることが明らかとなった。

PGE₂ 処置細胞においては、処置 7 日後で細胞死の誘導が認められた。当研究室では、既にニューロン様に分化した NSC-34 に対する PGE₂ の細胞死誘導作用を報告しており(31)、処置 7 日後の細胞死は、この報告に一致するものだと考えられた。これまでに、ラット海馬由来神経幹細胞に対して分化誘導作用を示す ciliary neurotrophic factor (75)が、初代培養ヒト骨格筋芽細胞における幹細胞マーカータンパク質の発現を誘導し、脱分化誘導作用を示すこと(76)が報告されている。PGE₂ も、初代培養ラット網膜ミューラーグリア細胞において幹細胞マーカータンパク質の発現を誘導するとともに細胞増殖を促進する作用を示すこと(77)が報告されており、PGE₂ が脱分化誘導作用も有することが明らかになりつつある。本研究において、PGE₂ 処置 3 日後においては、位相差顕微鏡による観察で細胞死が誘導されているとは考えにくいにもかかわらず、処置 2 日後と比較し、神経突起伸長細胞の減少傾向が認められることから、脱分化誘導作用が関与する可能性について否定はできない。しかし、PGE₂ 処置は、3 日目以降、細胞増殖作用を示すことはなく、7 日後には、ほぼ全ての細胞が死に至ったことから、脱分化誘導作用を示している可能性は低いと考えられる。

これまでの研究において、RA 72 時間処置によりニューロン様に分化した NSC-34 は、神経の電気生理学的指標である活動電位を発生するという特性を持つことが報告されている(14)。本研究では、RA 処置 7 日後の NSC-34 において、活動電位の発生が認めら

れた。実験条件の違いを考慮する必要はあるが、7日間のRA処置後に認められた活動電位の波形は、既報(14)のRA 72時間処置では認められなかった過分極相が認められ、より典型的な活動電位の波形を示したことから、RA処置7日後の細胞は、72時間後と比較して、より成熟したニューロン様細胞である可能性が示唆された。

活動電位は、PGE₂処置細胞においても、RA処置細胞と同様に認められ、PGE₂も電気生理学的な機能を有するニューロンへと分化させることが明らかとなった。PGE₂処置細胞とRA処置細胞との間で、閾値電位、ピーク電位及び振幅に差は認められず、同様の活動電位の波形パターンを示したが、両処置の間では、活動電位の発生に必要な閾値電流に差が認められ、RA処置細胞よりPGE₂処置細胞の方が有意に低い値を示した。これまでに、マウス運動ニューロンにおいて、8-11日齢のマウスの閾値電流の平均が約300 pAであるのに対して、43-68日齢のマウスの閾値電流の平均が約110 pAであることが報告され、成熟に伴い閾値電流が減少することが明らかになっている(78,79)。本研究において、PGE₂処置細胞における閾値電流は、RA処置細胞の閾値電流と比較して、その値が有意に減少し、マウス運動ニューロンにおいて記録された閾値電流に近い値を示したことから、PGE₂処置細胞がRA処置細胞と比較して、電気生理学的に成熟度の高い運動ニューロンへと分化していることが明らかとなった。

ヒトiPS細胞から分化したニューロンでは、分化の進行や成熟に伴い、細胞内Na⁺流入に由来する電位依存性イオン電流密度が増大し、活動電位の発生や頻度が増加することが報告されている(80)。また、ヒトES細胞由来の運動ニューロンにおける活動電位の発生は、TTXによって完全に消失することが報告されている(73,81)。これらの結果は、Navを介した細胞内Na⁺流入の増大が、運動ニューロンの成熟に伴う活動電位の発生に中心的な役割を果たすことを示唆している。本研究において、電位依存性イオン電流は、Na⁺を除去したaCSFあるいはTTXを含むaCSFの還流により完全に消失したことから、PGE₂処置細胞及びRA処置細胞における活動電位の発生には、主にNavが関与することが明らかとなった。また、電位依存性イオン電流の密度は、vehicle処置細胞と比較して、PGE₂処置細胞では有意な増大が認められたが、RA処置細胞では増加傾向に留まったことから、PGE₂処置細胞の電気生理学的な成熟度がRA処置細胞より高いことが明らかとなった。

神経分化マーカーのタンパク質発現解析により運動ニューロンとしての分化度や成熟度を生化学的に検証した。ニューロンの分化マーカーであり、分化初期段階から増加す

る微小管結合タンパク質 MAP2c 及び成熟段階から増加するシナプス小胞膜タンパク質 synaptophysin の発現は、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞において、同程度の増加が認められたことから、ともにニューロンに分化していることが明らかとなった。これまでに、RA によってニューロン様に分化した NSC-34 において、運動ニューロン前駆細胞の細胞増殖停止後から増加し続ける転写因子である HB9 及び Islet-1 が発現していることが報告されている(13)。本研究でも、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞において HB9 及び Islet-1 の発現上昇が認められ、両群間に差が認められなかったことから、両処置細胞ともに運動ニューロンに分化していることが明らかとなった。運動ニューロンとしての機能的な成熟度を比較するマーカータンパク質として、運動ニューロンの成熟段階から発現が増加し、運動ニューロンのコリン作動性機能の状態を反映する ACh 合成酵素 ChAT が汎用されている(7)。これまでに、RA 処置によってニューロン様に分化した NSC-34 においても、分化の進行に伴い ChAT の mRNA レベルが増加すること(12)、RA 処置 7 日後において ChAT がタンパク質レベルで発現していること(17)が報告されている。本研究においても、RA 処置細胞の ChAT のタンパク質発現レベルは、vehicle 処置細胞と比較して有意に増加したが、PGE₂ 処置細胞の発現レベルより、有意に低かった。以上より、電気生理学的特徴からだけではなく、マーカータンパク質の発現解析からも PGE₂ 処置細胞の運動ニューロンとしての成熟度が RA 処置細胞より高いことが明らかとなった。

これまでの *in vitro* ニューロンモデルの成熟度については、活動電位の発生や神経分化マーカーのタンパク質発現による評価が用いられていた(66,82)が、本研究では、これらに加えて、機能評価のひとつである ACh 放出能に着目し、培養液中の ACh 量の測定を行った。RA 処置細胞からの ACh 放出量は、vehicle 処置細胞と比較して、有意ではないものの減少する傾向を示したのに対して、PGE₂ 処置細胞からの ACh 放出量は、vehicle 処置細胞と比較して、有意に増加した。以上より、PGE₂ 処置細胞は、ACh 放出能を有する機能的な運動ニューロンへと分化していることが明らかとなった。

RA により分化を誘導した NSC-34 において、シナプス小胞への ACh 輸送に関与する vesicular acetylcholine transporter (VACHT)の mRNA レベルが、処置 8 日後まで、未分化の細胞と比較して変化しないことが報告されている(12)。本研究において、RA 7 日処置細胞において、ChAT は、vehicle 処置細胞より上昇していたにもかかわらず、両処置細胞の ACh 放出量には、有意な差は認められなかった。これらを考え併せると、ACh の放出には、VACHT が何らかの役割を持つと予想され、ACh 放出量が増加した

PGE₂ 処置細胞では、VAcT の発現が増加している可能性が考えられる。PGE₂ 処置細胞と RA 処置細胞で、ACh 放出能に差があったことは非常に興味深い知見であるが、その機序に関しては、今後、詳細な検討が必要である。

本章をまとめると、PGE₂ は、NSC-34 において、従来用いられてきた RA より、迅速に神経突起伸長作用を示すこと、及び機能的な運動ニューロンの特性を有するより成熟度の高い細胞へ分化させることが明らかとなった。

3-5 小括

PGE₂により神経突起を伸長した NSC-34 の運動ニューロン特性を電気生理学的及び生化学的に RA 処置の場合と比較し、以下の知見を得た。

1. PGE₂ 処置細胞は、2 日間で、RA 処置細胞 7 日目と同程度の神経突起伸長作用を示した。
2. PGE₂ 処置細胞は、RA 処置細胞と比較して、低い閾値電流で活動電位を発生させた。
3. PGE₂ 処置細胞の電位依存性イオン電流密度は、vehicle 処置細胞と比較して、有意に増大したが、RA 処置細胞の電流密度は増加傾向に留まった。また、NSC-34 において記録された電位依存性イオン電流は、Na⁺除去した aCSF もしくは TTX を含む aCSF の還流により完全に消失した。
4. MAP2c、synaptophysin、HB9 及び Islet-1 の発現レベルの増加は、PGE₂ 処置細胞及び RA 処置細胞で認められ、いずれも同程度増加した。
5. PGE₂ 処置細胞における ChAT の発現レベルは、RA 処置細胞の発現レベルと比較して有意に増加した。
6. PGE₂ 処置細胞から培養液中への ACh 放出量は、vehicle 処置細胞及び RA 処置細胞と比較して有意に増加したが、RA 処置細胞からの ACh 放出量は、vehicle 処置細胞と比較して有意な差を示さなかった。

以上の結果より、PGE₂ は、NSC-34 において、従来用いられてきた RA と比較して、迅速な神経突起伸長作用を示し、実際の運動ニューロンにより近い低い閾値電流による活動電位の発生や ACh を合成及び放出する機能的な運動ニューロンの特性を有する成熟度の高い細胞へ分化させることが明らかとなった。

第四章

総括

本研究では、より迅速な運動ニューロン分化誘導法を確立するため、新たな分化誘導因子の同定を目的とし、運動ニューロン様株化細胞 NSC-34 において、PGE₂ の運動ニューロン分化に及ぼす影響を検討し、以下の知見を得た。本研究の結果の概要を Fig. 18 に示した。

1. PGE₂ は、EP2 を介して、未分化の NSC-34 の増殖を抑制し、神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。また、PGE₂ のニューロン分化促進作用には EP2 の活性化を介した細胞内 cAMP の上昇が少なくとも一部関与することが示唆された。
2. PGE₂ は、従来用いられてきた RA と比較して、迅速な神経突起伸長作用を示し、実際の運動ニューロンに近い低い閾値電流による活動電位の発生や ACh を合成及び放出する機能的な運動ニューロンの特性を有するより成熟度の高い細胞へ分化させることが明らかとなった。

本検討結果は、PGE₂ が、運動ニューロンにおいて、分化誘導因子となることを明らかにし、その誘導速度及び成熟度の高さから、RA よりも優れた誘導因子となる可能性を示唆したものである。本研究の成果を今後、iPS 細胞に応用することにより、運動ニューロン病に対する再生医療実現の一助となることが期待される。

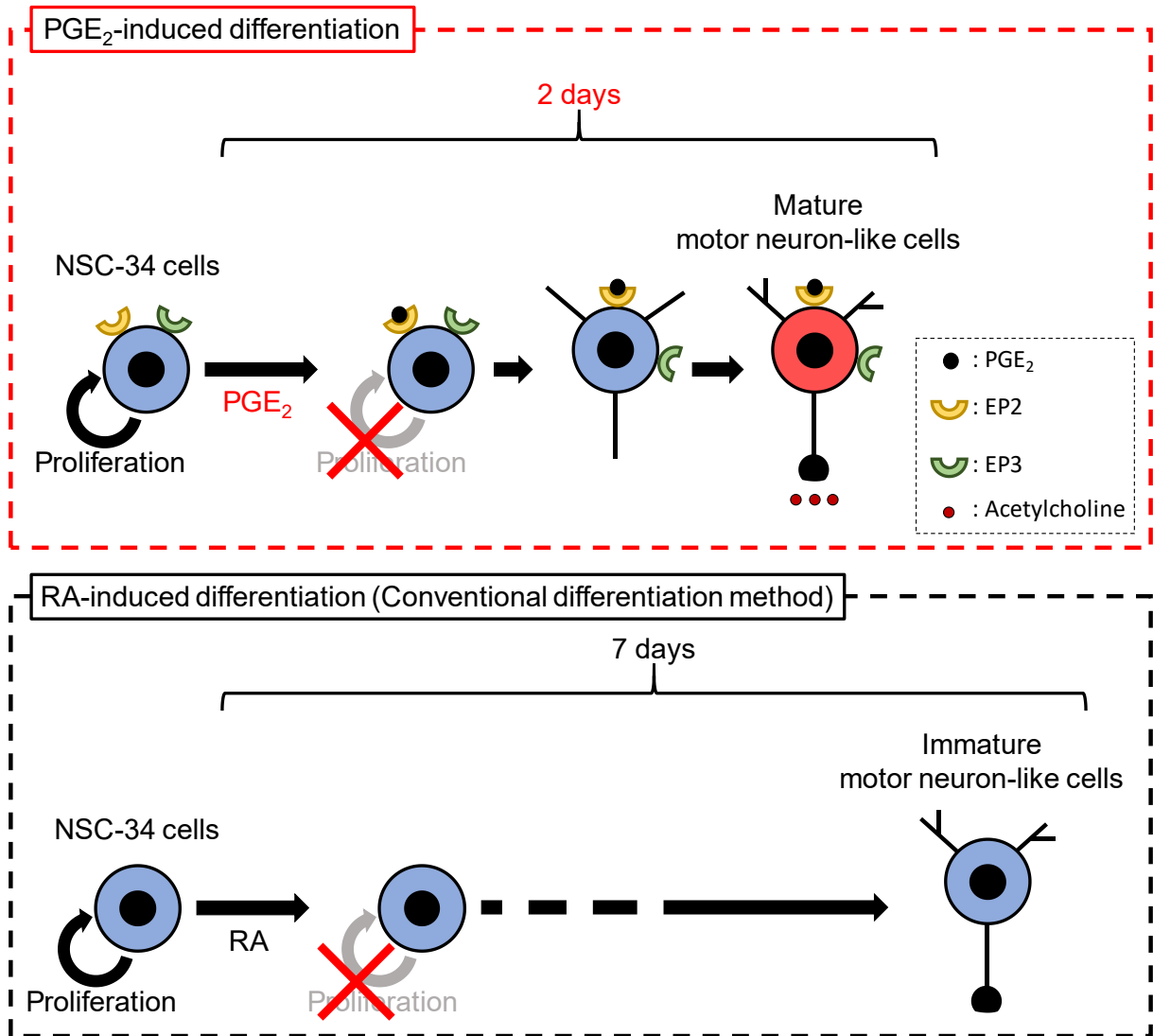


Fig. 18 A schematic diagram showing the comparison of PGE₂- and RA-induced cell differentiation, and the mechanism of PGE₂-induced cell differentiation in NSC-34 cells.

参考文献

- (1) Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494:100–104.
- (2) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2012;4:145ra104.
- (3) Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, Nakamura R, Akiyama T, et al. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med*. 2018;24:1579–1589.
- (4) Tintignac LA, Brenner H-R, Rüegg MA. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiol Rev*. 2015;95:809–852.
- (5) Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013;79:416–438.
- (6) Burghes AHM, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:597–609.
- (7) Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, Ishihara Y, Hattori C, Miwa Y, et al. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 2015;8:79–93.
- (8) Du Z-W, Chen H, Liu H, Lu J, Qian K, Huang C-L, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2015;6:6626–6634.
- (9) Yoshida M, Kitaoka S, Egawa N, Yamane M, Ikeda R, Tsukita K, et al. Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem cell reports*. 2015;4:561–568.
- (10) Goparaju SK, Kohda K, Ibata K, Soma A, Nakatake Y, Akiyama T, et al. Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs

- encoding transcription factors. *Sci Rep.* 2017;7:42367–42378.
- (11) Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, et al. Neuroblastoma × spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn.* 1992;194:209–221.
 - (12) Maier O, Böhm J, Dahm M, Brück S, Beyer C, Johann S, et al. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2013;62:1029–1038.
 - (13) Johann S, Dahm M, Kipp M, Zahn U, Beyer C. Regulation of choline acetyltransferase expression by 17 β -oestradiol in NSC-34 cells and in the spinal cord. *J Neuroendocrinol.* 2011;23:839–848.
 - (14) Arumugam S, Garcera A, Soler RM, Tabares L. Smn-deficiency increases the intrinsic excitability of motoneurons. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:1–13.
 - (15) Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Subramaniam JR, Nalini A, Raju TR. Cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line. *Brain Res.* 2009;1263:122–133.
 - (16) Liu X, Xu S, Wang P, Wang W. Transient mitochondrial permeability transition mediates excitotoxicity in glutamate-sensitive NSC34D motor neuron-like cells. *Exp Neurol.* 2015;271:122–130.
 - (17) Lee SH, Choi NY, Yu HJ, Park J, Choi H, Lee KY, et al. Atorvastatin protects NSC-34 motor neurons against oxidative stress by activating PI3K, ERK and free radical scavenging. *Mol Neurobiol.* 2016;53:695–705.
 - (18) Keilhoff G, Mbou RP, Lucas B, Schild L. The differentiation of spinal cord motor neurons is associated with changes of the mitochondrial phospholipid cardiolipin. *Neuroscience.* 2019;400:169–183.
 - (19) Keilhoff G, Lucas B, Pinkernelle J, Steiner M, Fansa H. Effects of cerebrolysin on motor-neuron-like NSC-34 cells. *Exp Cell Res.* 2014;327:234–255.
 - (20) Kupersmidt L, Weinreb O, Amit T, Mandel S, Carri MT, Youdim MBH. Neuroprotective and neuritogenic activities of novel multimodal iron-chelating drugs in motor-neuron-like NSC-34 cells and transgenic mouse model of

- amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* 2009;23:3766–3779.
- (21) Yagi H, Ohkawara B, Nakashima H, Ito K, Tsushima M, Ishii H, et al. Zonisamide enhances neurite elongation of primary motor neurons and facilitates peripheral nerve regeneration in vitro and in a mouse model. *PLoS One.* 2015;10:1–16.
 - (22) Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871–1875.
 - (23) Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, et al. Prostaglandin E2-EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J Immunol.* 2014;192:1130–1137.
 - (24) Reinold H, Ahmadi S, Depner UB, Layh B, Heindl C, Hamza M, et al. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *J Clin Invest.* 2005;115:673–679.
 - (25) Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci.* 2004;9:1977–1993.
 - (26) Hayaishi O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D2 and E2. *FASEB J.* 1991;5:2575–2581.
 - (27) Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007;282:11613–11617.
 - (28) Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek–Wiener J, Deecke L, Kostic V, et al. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology.* 2002;58:1277–1279.
 - (29) Klivenyi P, Kiaei M, Gardian G, Calingasan NY, Beal MF. Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2004;88:576–582.
 - (30) Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the spinal cord in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 2012;118:225–236.
 - (31) Miyagishi H, Kosuge Y, Yoneoka Y, Ozone M, Endo M, Osada N, et al. Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.* 2013;121:347–350.

- (32) Kosuge Y, Miyagishi H, Yoneoka Y, Yoneda K, Nango H, Ishige K, et al. Pathophysiological role of prostaglandin E₂-induced up-regulation of the EP₂ receptor in motor neuron-like NSC-34 cells and lumbar motor neurons in ALS model mice. *Neurochem Int.* 2017;119:2–9.
- (33) Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E₂ induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett.* 2002;317:61–64.
- (34) Ikeda-Matsuo Y, Miyata H, Mizoguchi T, Ohama E, Naito Y, Uematsu S, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor in dopaminergic neurodegeneration in parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2019;124:81–92.
- (35) Zhang Y, Desai A, Yang SY, Bae KB, Antczak MI, Fink SP, et al. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science.* 2015;348:aaa2340.
- (36) Goncalves MB, Williams EJ, Yip P, Yáñez-Muñoz RJ, Williams G, Doherty P. The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2010;159:1118–1125.
- (37) Falik Zaccari TC, Savitzki D, Zivony-Elboum Y, Vilboux T, Fitts EC, Shoval Y, et al. Phospholipase A₂-activating protein is associated with a novel form of leukoencephalopathy. *Brain.* 2017;140:370–386.
- (38) Negishi M, Hasegawa H, Ichikawa A. Prostaglandin E receptor EP₃ γ isoform, with mostly full constitutive G_i activity and agonist-dependent G_s activity. *FEBS Lett.* 1996;386:165–168.
- (39) Hardwick LJA, Ali FR, Azzarelli R, Philpott A. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2015;359:187–200.
- (40) Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8:194–205.
- (41) Sierra-Fonseca JA, Najera O, Martinez-Jurado J, Walker EM, Varela-Ramirez A, Khan AM, et al. Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G $\beta\gamma$ -microtubule interaction. *BMC Neurosci.* 2014;15:132–150.
- (42) Won JH, Ahn KH, Back MJ, Ha HC, Jang JM, Kim HH, et al. DA-9801 promotes

- neurite outgrowth via ERK1/2-CREB pathway in PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:169–178.
- (43) Chen S, Luo M, Zhao Y, Zhang Y, He M, Cai W, et al. Fasudil stimulates neurite outgrowth and promotes differentiation in C17.2 neural stem cells by modulating notch signalling but not autophagy. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36:531–541.
- (44) Hiruma H, Ichikawa T, Kobayashi H, Hoka S, Takenaka T, Kawakami T. Prostaglandin E2 enhances axonal transport and neuritogenesis in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2000;100:885–891.
- (45) Mitani K, Sekiguchi F, Maeda T, Tanaka Y, Yoshida S, Kawabata A. The prostaglandin E2/EP4 receptor/cyclic AMP/T-type Ca²⁺ channel pathway mediates neuritogenesis in sensory neuron-like ND7/23 cells. *J Pharmacol Sci.* 2016;130:177–180.
- (46) Tamiji J, Crawford DA. Prostaglandin E2 and misoprostol induce neurite retraction in Neuro-2a cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398:450–456.
- (47) Oda T, Kume T, Katsuki H, Niidome T, Sugimoto H, Akaike A. Donepezil potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Pharmacol Sci.* 2007;104:349–354.
- (48) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
- (49) Zhu P, Genc A, Zhang X, Zhang J, Bazan NG, Chen C. Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. *J Neurosci Res.* 2005;81:817–826.
- (50) Kim H, Zahir T, Tator CH, Shoichet MS. Effects of dibutyryl cyclic-AMP on survival and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells transplanted into spinal cord injured rats. *PLoS One.* 2011;6:1–12.
- (51) Hindley C, Philpott A. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system. *Biochem J.* 2012;444:375–382.
- (52) Stifani N. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–22.

- (53) Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Han HJ. Interaction between PGE2 and EGF receptor through MAPKs in mouse embryonic stem cell proliferation. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1603–1616.
- (54) Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carrière MC, Denis D, Godbout C, et al. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1483:285–293.
- (55) Hannila SS, Filbin MT. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2008;209:321–332.
- (56) Aglah C, Gordon T, Posse de Chaves EI. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of ERK activation in cultured rat motoneurons. *Neuropharmacology.* 2008;55:8–17.
- (57) Través PG, Pimentel-Santillana M, Carrasquero LMG, Pérez-Sen R, Delicado EG, Luque A, et al. Selective impairment of P2Y signaling by prostaglandin E2 in macrophages: implications for Ca²⁺-dependent responses. *J Immunol.* 2013;190:4226–4235.
- (58) Chen SH, Sung YF, Oyarzabal EA, Tan YM, Leonard J, Guo M, et al. Physiological concentration of prostaglandin E2 exerts anti-inflammatory effects by inhibiting microglial production of superoxide through a novel pathway. *Mol Neurobiol.* 2018;55:8001–8013.
- (59) Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL. Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev.* 2005;19:282–294.
- (60) Thaler J, Harrison K, Sharma K, Lettieri K, Kehrl J, Pfaff SL. Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9. *Neuron.* 1999;23:675–687.
- (61) Liang X, Song MR, Xu ZG, Lanuza GM, Liu Y, Zhuang T, et al. Isl1 is required for multiple aspects of motor neuron development. *Mol Cell Neurosci.* 2011;47:215–222.
- (62) Albala JS, Kress Y, Liu WK, Weidenheim K, Yen SH, Shafit-Zagardo B. Human

- microtubule-associated protein-2c localizes to dendrites and axons in fetal spinal motor neurons. *J Neurochem.* 1995;64:2480–2490.
- (63) Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. Requirement for the homeobox gene HB9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron.* 1999;23:659–674.
- (64) Lee S, Cuvillier JM, Lee B, Shen R, Lee JW, Lee SK. Fusion protein Isl1-Lhx3 specifies motor neuron fate by inducing motor neuron genes and concomitantly suppressing the interneuron programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:3383–3388.
- (65) Das M, Rumsey JW, Bhargava N, Stancescu M, Hickman JJ. A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. *Biomaterials.* 2010;31:4880–4888.
- (66) Davis-Dusenbery BN, Williams LA, Klim JR, Eggan K. How to make spinal motor neurons. *Development.* 2014;141:491–501.
- (67) Shiozaki Y, Sato M, Kimura M, Sato T, Tazaki M, Shibukawa Y. Ionotropic P2X ATP receptor channels mediate purinergic signaling in mouse odontoblasts. *Front Physiol.* 2017;8:1–10.
- (68) Auld DS, Day JC, Mennicken F, Quirion R. Pharmacological characterization of endogenous acetylcholine release from primary septal cultures. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:692–697.
- (69) Kiguchi Y, Aono Y, Watanabe Y, Yamamoto-Nemoto S, Shimizu K, Shimizu T, et al. In vivo neurochemical evidence that delta1-, delta2- and mu2-opioid receptors, but not mu1-opioid receptors, inhibit acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 2016;789:402–410.
- (70) Kole MHP, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci.* 2008;11:178–186.
- (71) Catterall W a, Goldin AL, Waxman SG. International union of pharmacology. XLVII. nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57:397–409.

- (72) Novitsch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron*. 2003;40:81–95.
- (73) Qu Q, Li D, Louis KR, Li X, Yang H, Sun Q, et al. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun*. 2014;5:3449–3461.
- (74) Petrozziello T, Secondo A, Tedeschi V, Esposito A, Sisalli M, Scorziello A, et al. ApoSOD1 lacking dismutase activity neuroprotects motor neurons exposed to beta-methylamino-L-alanine through the Ca²⁺/Akt/ERK1/2 prosurvival pathway. *Cell Death Differ*. 2017;24:511–522.
- (75) Ding J, He ZL, Ruan J, Liu Y, Gong CX, Sun SG, et al. Influence of endogenous ciliary neurotrophic factor on neural differentiation of adult rat hippocampal progenitors. *Neural Regen Res*. 2013;8:301–312.
- (76) Chen X, Mao Z, Liu S, Liu H, Wang X, Wu H, et al. Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro. *Mol Biol Cell*. 2005;16:3140–3151.
- (77) Wang L, Lang LL, Wang Y, Shi S, Liu L. Prostaglandin E2 enhances proliferation, dedifferentiation and stem-like properties of rat retinal müller glial cells in vitro. *Ophthalmic Res*. 2013;49:100–107.
- (78) Mitra P, Brownstone RM. An in vitro spinal cord slice preparation for recording from lumbar motoneurons of the adult mouse. *J Neurophysiol*. 2012;107:728–741.
- (79) Nakanishi ST, Whelan PJ. Diversification of intrinsic motoneuron electrical properties during normal development and botulinum toxin-induced muscle paralysis in early postnatal mice. *J Neurophysiol*. 2010;103:2833–2845.
- (80) VanderWall KB, Vij R, Ohlemacher SK, Sridhar A, Fligor CM, Feder EM, et al. Astrocytes regulate the development and maturation of retinal ganglion cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2019;12:201–212.
- (81) Calder EL, Tchieu J, Steinbeck JA, Tu E, Keros S, Ying SW, et al. Retinoic acid-mediated regulation of GLI3 enables efficient motoneuron derivation from human ESCs in the absence of extrinsic SHH activation. *J Neurosci*. 2015;35:11462–

11481.

- (82) Beaudet M-J, Yang Q, Cadau S, Blais M, Bellenfant S, Gros-Louis F, et al. High yield extraction of pure spinal motor neurons, astrocytes and microglia from single embryo and adult mouse spinal cord. *Sci Rep.* 2015;5:16763–16774.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始御指導・御助言賜りました日本大学薬学部薬理学研究室 石毛 久美子 教授に衷心より謹んで深謝の意を表します。また、本研究を始めるに際して御理解と御支援を賜りました日本大学薬学部薬理学研究室前教授(現・横浜薬科大学薬学部薬学教育センター特任教授) 伊藤 芳久 先生に深謝致します。さらに、本研究を遂行するにあたり多くの御指導・御助言を頂きました日本大学薬学部薬理学研究室 小菅 康弘 准教授、宮岸 寛子 助教に深謝致します。並びに、共に研究を遂行してきた日本大学薬学部薬理学研究室の学部生に心から感謝致します。

電気生理学的手法を用いた解析法の修得にあたり多くの御教授を賜りました東京歯科大学生理学講座 前教授 田崎 雅和 先生、澁川 義幸 教授、木村 麻記 講師、生物学研究室 佐藤 正樹 講師に深謝致します。並びに、各種実験を助けて頂きました東京歯科大学生理学講座の大学院生の御支援に心から感謝致します。

Acetylcholine 量の測定及び解析にあたり多くのアドバイスを賜りました日本大学松戸歯学部薬理学講座 三枝 禎 教授、青野 悠里 専修研究員に深謝致します。

本論文の作成にあたり貴重な御助言を賜りました日本大学薬学部機能形態学研究室 木澤 靖夫 教授、生化学研究室 小林 俊亮 教授に深く深謝致します。

最後に、長い学生生活を続けるにあたり、支援し信頼し続けてくれた両親と家族に心から感謝致します。