

Title	Mouse semaphorin HによるPC12細胞突起伸長作用の解析
Author(s)	阪井, 丘芳
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155623
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Mouse semaphorin H による PC12 細胞突起伸長作用の解析

阪井 丘芳

Takayoshi SAKAI

Analysis of PC12 cell neurite outgrowth activity induced by mouse semaphorin H

学位論文

Mouse semaphorin H による PC12 細胞突起伸長作用の解析

口腔外科学第一講座

阪井 丘芳

緒言

神経回路は誘引因子や反発因子などの様々な環境因子とそれに応答する軸索や成長円錐との相互作用によって形成される。collapsin I はニワトリ知覚神経軸索の反発因子として見出された分子であり、哺乳類では semaphorin D (sema D) として見出され、その共通なドメインとしてセマドメインを有している。sema D は軸索反発分子として神経回路形成に関与すると考えられている¹⁾。Miyazaki らによって同定された Mouse semaphorin H (MSH) は最初に反発因子として見出された Mouse semaphorin D (MSD) と同じ分泌型分子で神経回路形成期に発現し、知覚神経に対して反発作用を有すると考えられている²⁾。MSH は 1998 年 Christensen ら³⁾ によりマウス腺癌の転移癌細胞株から同定された分子と一部のアミノ酸残基配列が異なるものの、同一分子と考えられる。最近では semaphorin 分子は軸索誘導研究以外に癌転移や抗癌剤の耐性に関与する分子として同定されるものなど神経反発作用以外に多彩な機能が示唆されているが、semaphorin による反発作用以外の作用やその機構はほとんど解明されていない。本研究では神経成長因子 (NGF) によって神経様突起を伸長し、神経様細胞に分化することが知られているラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株 (PC12 細胞) を用いて MSH の作用について検討を加えた。

PC12 細胞は通常、楕円形あるいは多角形であり、NGF によって増殖が抑制され、神経様突起を伸長し、神経様細胞に分化する⁴⁾。受容体型チロシンキナーゼである TrkA は NGF と結合すると二量体を形成し、自身のもつチロシンキナーゼにより自己リン酸化される。TrkA が自己リン酸化されると SHC、PLC γ -1 等が SH2 (Src homology 2) ドメインを介して TrkA のリン酸化チロシン残基に結合する。PLC γ -1 は結合後、リン酸化・活性化され、細胞内カルシウムイオンの動員や PKC の活性化を引き起こす。一方、SHC はリン酸化・活性化されると Grb2、SOS を介して Ras を活性化し、MAPK カスケードを活性化する⁵⁾。以上の NGF における情報伝達機構を参考にして Ras-MAPK カスケードと PKC、カルシウムイオンの関与を中心に MSH による PC12 細胞突起伸長作用の情報伝達機構の解析を試みた。

材料および方法

1. 実験試薬

NGF 7S (mouse) は Boehringer mannheim (Germany) より購入した。PD98059 は RBI (U.S.A.)より購入した。K-252a は ALEXIS corporation (U.S.A.)より購入した。calphostin C、Gö6983 は和光純薬工業 (大阪) より購入した。diltiazem は GIBCO-BRL (U.S.A.)より購入した。 ω -conotoxin GVIA は alomone labs (Israel) より購入した。

2. 細胞株

Dominant negative Ras (DN-Ras) を発現する PC12 細胞 (PC12Ha RHK 細胞) と control vector を導入した PC12 細胞 (PC12Ha XMV 細胞) は服部成介博士⁶⁾より恵与を受けた。PC12 細胞の培養は全て 10 % FBS (JRH, Australia) および 50 U/ml ペニシリン G (和光純薬工業, 大阪) 含有 DMEM (High Glucose) (日研生物医学研究所, 京都) を用いて 37 °C、5 % CO₂ の条件で行った。MSH-AP 発現 NIH3T3 細胞は古山達雄博士より恵与を受け、AP 発現 NIH3T3 細胞は稲垣忍教授²⁾より恵与を受けた。それぞれの NIH3T3 細胞は 10 % FBS、50 U/ml ペニシリン G 含有 DMEM を用いて 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。

3. リコンビナント MSH の発現と定量

MSH-AP 発現 NIH3T3 細胞と AP 発現 NIH3T3 細胞を PBS (-) で 2 回洗浄後、無血清の DMEM を用いて 48 時間培養し、培養上清を回収し、セントリコンで濃縮したものを MSH-AP または AP として用いた。発現量は p-nitrophenylphosphate (和光純薬工業, 大阪) を用いた McComb⁷⁾らの方法で 48 時間後の培養上清中の AP 活性を分光光度計 (OD 405 nm) にて測定し、AP 活性から MSH-AP と AP のタンパク量を換算した。MSD 蛋白は 293T 細胞に発現させて用いた。

4. PC12 細胞の突起伸長実験

poly-L-lysine (Sigma, U.S.A.) コートした 24 穴プレート (Coster, U.S.A.) で 1 穴あたり 1×10^4 個の PC12 細胞を 37 °C、5 % CO₂ で培養し、24 時間後あるいは 48 時

間経過後観察した。Doherty⁸⁾らの方法に基づいて位相差顕微鏡で少なくとも三視野、100 から 150 個程度の細胞を観察し、一視野あたり最長の突起が 20 μm より長い PC12 細胞の占める割合 (%) を計算した。なお、同一の実験を 3 回以上行い、平均及び標準誤差を計算した。

5. 抗体と各薬剤を用いた PC12 細胞の突起伸長実験

抗 AP 抗体での吸収実験は MSH-AP と AP 1 ml にマウス抗 AP 抗体ビーズ 5 μl 加え、1 時間 4 $^{\circ}\text{C}$ で反応させて遠心後、上清を用いた。なお、回収した上清は AP 活性が消失したことを確認した上で使用した。

MEK1 阻害剤 PD98059⁹⁾、TrkA 阻害剤 K-252a¹⁰⁾、PKC 阻害剤 calphostin C^{11,12)} および Gö6983¹³⁾、L 型電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 diltiazem⁸⁾、N 型電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 ω -conotoxin⁸⁾ はそれぞれ 15 分間 PC12 細胞を前処理し、同じ濃度の薬剤を含む最終濃度 1 nM の MSH-AP、50 ng/ml NGF 含有 DMEM を追加混入した。24 時間後、前述した方法で PC12 細胞の突起伸長を評価した。なお、PD98059、K-252a、calphostin C および Gö6983 は DMSO で希釈したため、DMSO の最終濃度が 0.1 % となるように添加した。なお、コントロールにおいても DMSO の最終濃度が 0.1 % となるように DMSO を添加した。また、diltiazem および ω -conotoxin は PBS (-) で希釈したため、PBS (-) の含有量が 0.1 % となるように添加した。なお、コントロールにおいても PBS (-) の含有量が 0.1 % となるように PBS (-) を添加した。

6. リン酸化 MAPK の検出

MSH-AP (1 nM) または NGF (50 ng/ml) 存在下で 2×10^5 個の PC12 細胞を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 で培養し、経時的に回収した。まず、PC12 細胞を 4 $^{\circ}\text{C}$ の PBS (-) (1 mM Na_3VO_4 を含む) で洗浄後、PC12 細胞に 20 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM NaF にタンパク分解阻害剤として 1 mM PMSF (BRL, U.S.A.) と 10 mg/ml の pepstatin A (Sigma, U.S.A.) を添加した溶液 50 μl

にさらに、サンプルバッファー (3 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glycerol, 0.1 % (w/v) bromphenol blue and 0.05 % (v/v) β -mercaptoethanol) を 100 μ l 加え、5 分間 100 °C で煮沸後、5 分間 4 °C で遠心 (12000 rpm) し、上清を回収し、サンプルとした。

10 % ポリアクリルアミドゲルを用い、タンパク量を一定にして SDS-PAGE を行い、Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, U.S.A.) を用いて PVDF 膜 (Immobilon-P Millipore, U.S.A.) に転写した。PVDF 膜は TBST (0.1 % Tween-20, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で室温 5 分間洗浄後、TBSTB (0.1 % BSA 含有 TBST) で室温 1 時間ブロッキングした。次に、一次抗体として TBSTB で希釈した抗リン酸化 MAPK 抗体 (PhosphoPlus p44/42 MAP Kinase Antibody Kit, N.E.B., U.S.A.) と室温 1 時間反応後、TBST で室温 5 分間、4 回洗浄した。TBSTB で希釈した HRP 標識抗ウサギ抗体を加えて、室温にて 1 時間反応後、TBST で室温にて 5 分間、4 回洗浄した。LumiGLO chemiluminescent reagent (Kirkegaard and Perry Lab. U.S.A.) を加え、Fuji Medical X-ray Film (富士写真フィルム, 神奈川) を用いてリン酸化 MAPK を検出した。MAPK の発現が一定量であることを確認するために同じ膜を 50 °C 30 分間、ストリッピングバッファー (62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2 % SDS, 100 mM β -mercaptoethanol) で処理後、一次抗体として 1000 倍希釈の抗 MAPK 抗体を用い、上述した方法で MAPK を検出した。

結果

1. MSH による PC12 細胞突起伸長作用

PC12 細胞を 1 nM の MSH-AP 存在下で培養すると 24 時間後に $85.3 \pm 4.7\%$ の細胞に突起伸長が認められた (図 1, 2)。一方、PC12 細胞を 50 ng/ml の NGF 存在下で 24 時間培養すると $80.7 \pm 3.2\%$ の細胞に突起伸長が認められた。しかしながら、コントロールである 1 nM AP 存在下では $13.6 \pm 2.9\%$ とほとんど突起伸長が認められなかった。知覚神経に対し強い反発活性を示す semaphorin 分子である MSD 存在下で培養した場合でも $5.9 \pm 2.0\%$ とほとんど突起伸長が認められなかった。また、MSH-AP と NGF 共存下では約 100% の PC12 細胞に突起伸長が認められ、相加作用があった (図 2)。

次に PC12 細胞の突起伸長作用に対する MSH-AP の濃度依存性について検討した。図 3 は 24 時間後の PC12 細胞の伸長した突起をもつ細胞の割合を評価したものである。濃度依存的に 20 μm より長い細胞の占める割合は増加し、2 nM で最大値ほぼ 100% に達した。MSH-AP の突起伸長作用の ED_{50} は 0.22 nM であった。以上の結果は MSH-AP が特異的に PC12 細胞に作用していることを示唆している。なお、以後の阻害実験では MSH-AP の濃度は 1 nM に設定し、24 時間で評価することにした。

次に PC12 細胞の突起伸長が培養上清中に存在する MSH-AP に特異的な作用であるかどうかを検討するために、MSH-AP (1 nM) を含む培養上清にマウス抗 AP 抗体セファロビーズを加え吸着させた後、ビーズを除いた培養上清を用いて PC12 細胞に対する作用が消失するかどうかを調べた。抗 AP 抗体ビーズで吸着後の培養上清では PC12 細胞の突起伸長作用は消失したが、抗 AP 抗体のかわりにマウス IgG を用いた場合には、突起伸長作用は消失しなかった。また、これらの処理は NGF の作用には影響を与えなかった (図 4)。以上の結果から、MSH が PC12 細胞の突起伸長を誘導することが明らかになった。

2. MEK 阻害剤による MSH の突起伸長作用に対する効果

NGF では突起伸長時に MAPK の活性化が必要であることが報告されている⁴⁾。

MSH も同様に MAPK の活性化を介して突起伸長を誘導するかどうかを検討するために、MEK1 の特異的な阻害剤である PD98059¹¹⁾を用いて阻害実験を行った。

MSH-AP による突起伸長は $75.8 \pm 4.2\%$ の PC12 細胞に認められていたが、 $50 \mu\text{M}$ の PD98059 で処理すると $4.0 \pm 2.6\%$ にまで減少した。また、NGF による突起伸長は $76.1 \pm 5.5\%$ の PC12 細胞に認められていたが、 $50 \mu\text{M}$ の PD98059 で処理すると $2.4 \pm 1.6\%$ にまで減少した。このように MSH-AP または NGF による突起伸長は PD98059 の濃度に依存的に阻害された。PD98059 による阻害効果の ID_{50} は MSH-AP の場合は $5.7 \mu\text{M}$ で、NGF の場合は $4.8 \mu\text{M}$ であった。しかしながら、PD98059 の溶媒である DMSO を同量添加しても NGF および MSH-AP による突起伸長作用は影響を受けなかった。以上の結果から MSH の突起伸長作用には NGF の場合と同様に MAPK の関与が示唆された (図 5)。

3. MSH あるいは NGF 刺激による MAPK リン酸化の検討

次に、MSH により MAPK の活性化が生じているかどうかを検討するために、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK のリン酸化を検出した。その結果、MSH-AP を PC12 細胞に加えて 2 分後には MAPK のリン酸化の亢進が確認され、5 分から 10 分後に強いピークをむかえ、60 分後にもリン酸化の亢進が持続していた (図 6)。一方、コントロールの AP 存在下では MAPK のリン酸化の亢進は確認されなかった。また、NGF を PC12 細胞に加えた場合には 5 分後に MAPK のリン酸化の亢進が確認され、5 分から 10 分後にリン酸化のピークをむかえ、MSH-AP と同様に 60 分後にもリン酸化の亢進が持続していた。以上の結果から MSH による PC12 細胞の突起伸長作用は MAPK の持続的な活性化を介していることが示唆された。

4. DN-ras 遺伝子産物発現による MSH または NGF の突起伸長作用への影響

MAPK カスケードの上流に存在する *ras* 遺伝子産物 (Ras) の関与を調べるために前述したように DN-Ras 発現細胞である PC12Ha RHK 細胞と mock 細胞である PC12HaXMV 細胞を用いて、 1 nM の MSH-AP、 50 ng/ml の NGF と 24 時間あるいは

は 48 時間培養後、両細胞に対する MSH または NGF の突起伸長作用を検討した。PC12Ha XMV 細胞では MSH-AP または NGF により突起伸長を示したが、PC12Ha RHK 細胞ではどちらを加えてもほとんど突起伸長を示さなかった (図 7A, B)。以上の結果から MSH による PC12 細胞の突起伸長作用は Ras の活性化を介していることが示唆された。

5. TrkA 阻害剤による MSH または NGF の突起伸長作用への影響

3, 4 の結果が MSH の突起伸長作用の情報伝達が NGF と同じ Ras-MAPK を介することを示したので、MSH の突起伸長作用が NGF 受容体である TrkA を介しているかどうかを検討した。TrkA のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する濃度のキナーゼ阻害剤 K-252a を用いて検討した¹⁰⁾。PC12 細胞を K-252a で処理し、MSH-AP と NGF の作用を検討した。その結果、MSH-AP による突起伸長は $81.1 \pm 5.0\%$ の PC12 細胞に認められていたが、100 nM の K-252a で処理しても $83.6 \pm 4.8\%$ とほとんど変化がなかった。また、NGF による突起伸長は $81.6 \pm 5.2\%$ の PC12 細胞に認められていたが、100 nM の K-252a で処理すると $5.2 \pm 4.5\%$ にまで減少した。NGF の突起伸長作用に対する K-252a の ID_{50} は 32 nM であった。このように NGF の突起伸長作用は K-252a の濃度依存的に阻害されたが、MSH-AP の突起伸長作用は抑制されなかった (図 8A, B)。以上の結果から MSH による PC12 細胞突起伸長作用は NGF の場合とは異なり、TrkA の活性化を介していないことが示唆された。

6. PKC 阻害剤による MSH または NGF の突起伸長作用への影響

MSH の突起伸長作用に対する PKC の活性化の関与について検討した。PC12 細胞を PKC 阻害剤 calphostin C^{11), 12)} または別の PKC 阻害剤 Gö6983¹³⁾ で処理し、PKC 活性化の阻害が MSH-AP または NGF の突起伸長作用へ及ぼす影響について調べた。その結果、MSH-AP による突起伸長は $83.0 \pm 6.5\%$ の PC12 細胞に認められていたが、100 nM の calphostin C で処理すると $13.9 \pm 4.2\%$ にまで減少した。同様に NGF による突起伸長は $81.8 \pm 6.8\%$ の PC12 細胞に認められていたが、100 nM の

calphostin C で処理すると $5.6 \pm 4.4\%$ にまで減少した (図 9A)。また、MSH-AP よる突起伸長は 100 nM の Gö6983 で処理すると $23.1 \pm 5.6\%$ にまで減少した。同様に NGF よる突起伸長は 100 nM の Gö6983 で処理すると $18.4 \pm 7.9\%$ にまで減少した (図 9B)。MSH-AP 作用に対する calphostin C の ID_{50} は 8.9 nM で、Gö6983 の ID_{50} は 33 nM であった。このように MSH-AP または NGF の突起伸長作用は calphostin C または Gö6983 の濃度依存的に妨げられた。以上の結果から MSH による PC12 細胞の突起伸長作用は PKC の活性化を伴うことが示唆された。

7. MSH または NGF の突起伸長作用へのカルシウムイオンの関与

L 型電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 diltiazem または神経に特異的な N 型電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 ω -conotoxin で PC12 細胞を処理^{8), 14)}し 15 分後、MSH-AP (1 nM) または NGF (50 ng/ml) で 24 時間培養後、PC12 細胞の突起伸長を調べた。その結果、MSH-AP よる突起伸長は $84.1 \pm 6.5\%$ の PC12 細胞に認められていたが、100 μ M の diltiazem で処理すると $13.9 \pm 5.3\%$ にまで減少した。ところが、 $90.6 \pm 5.9\%$ の PC12 細胞に認められていた NGF よる突起伸長は 100 μ M の diltiazem で処理したにも関わらず、 $86.9 \pm 4.5\%$ とほとんど影響がみられなかった (図 10A)。同様に MSH-AP よる突起伸長は 1 μ M の ω -conotoxin で処理すると $38.2 \pm 4.8\%$ にまで減少した。ところが、NGF よる突起伸長は 1 μ M の ω -conotoxin で処理したにも関わらず、 $84.4 \pm 4.7\%$ とほとんど影響がみられなかった (図 10B)。MSH-AP に対する diltiazem の ID_{50} は 25 μ M で、 ω -conotoxin の ID_{50} は 0.55 μ M であった。このように MSH-AP の PC12 細胞の突起伸長作用は diltiazem あるいは ω -conotoxin のいずれに対しても濃度依存的に阻害された。一方、NGF による PC12 細胞の突起伸長作用は diltiazem あるいは ω -conotoxin のいずれに対しても阻害されなかった。以上の結果から、細胞外カルシウムの流入が MSH-AP による PC12 細胞の突起伸長に必要であることが示唆された。

次に、MSH-AP による PC12 細胞の MAPK の活性化に細胞外カルシウムが必要であるかどうかを検討するために、EGTA による細胞外カルシウム除去の MAPK のリン酸

化に及ぼす影響について検討した。その結果、2 mM の EGTA により MSH-AP による MAPK のリン酸化が抑制され、5 mM の EGTA ではさらに強く MAPK のリン酸化が抑制された（図 11）。一方、NGF による MAPK リン酸化作用は 2 mM あるいは 5 mM のいずれの濃度の EGTA でも抑制されなかった。一方、コントロールや DMEM では MAPK のリン酸化が起こらなかった。

以上の結果から、MSH による PC12 細胞の突起伸長作用は、電位依存性カルシウムチャンネルからの細胞外カルシウムの流入が必須で、それに引き続く MAPK の活性化により誘導されることが示唆された。

考察

本研究において、知覚神経に対して反発作用を有する MSH が PC12 細胞に対して突起伸長を誘導することを初めて見出した。この突起伸長作用はコントロールである AP のみを発現させた培養上清では認められず、MSH-AP の濃度に依存的であることと、培養上清中の MSH-AP を抗 AP 抗体により吸収した後ではその作用が消失したことから、本作用は MSH に特異的な作用であると考えられる。

次に、この MSH による PC12 細胞の突起伸長作用の情報伝達機構を解析するため、PC12 細胞に対して同様に突起伸長作用を有する代表的な成長因子である NGF⁵⁾の情報伝達機構と比較検討した。はじめに、多くの細胞の分化や増殖の制御で重要な働きをしていることが知られている MAPK カスケードの関与について検討した。MAPK の上流にある MEK1 を阻害することで MAPK を特異的に阻害する MAPK 阻害剤 PD98059⁹⁾は、MSH または NGF による突起伸長作用をほぼ同濃度で抑制した。更に、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いた解析から MSH は NGF と同程度の持続的な MAPK の活性化を示した。NGF が PC12 細胞に突起伸長を誘導する時に MAPK の持続的な活性化を必要とすることが報告されていることから¹⁵⁾、MSH による PC12 細胞の突起伸長には NGF の場合と同様に MAPK の持続的な活性化が関与していると考えられる。

一般的に MAPK カスケードは Ras により活性化されることが報告されている¹⁵⁾が、MSH の PC12 細胞の突起伸長作用が NGF と同様に dominant-negative Ras 発現細胞では観察されなかったことから、MSH の突起伸長作用は Ras-MAPK カスケードを用いていると考えられる。また、NGF による PC12 細胞の突起伸長作用が PKC 阻害剤により抑制されることから NGF の作用に PKC が関与すると報告されている¹⁶⁾。MSH による突起伸長作用も PKC 阻害剤である calphostin C^{11,12)}または Gö6983¹³⁾により抑制されたことから NGF と同様に PKC が関与していると考えられる。

以上の結果から MSH の突起伸長作用は Ras-MAPK カスケードおよびその下流において NGF の場合と共通の機構を利用していると考えられるが、MSH の受容体を含む初期過程の情報伝達機構は全く不明である。しかしながら、NGF の受容体 TrkA のチロシンキナーゼ阻害剤である K-252a¹⁰⁾が MSH の突起伸長作用を阻害しなかった

ことから MSH が TrkA とは異なる受容体と結合し、Ras-MAPK カスケードの上流で NGF の場合とは異なる情報伝達機構を介している可能性が示唆された。実際、L 型または N 型のカルシウムチャネル阻害剤である diltiazem と ω -conotoxin^{8,14)} が MSH による突起伸長作用を阻害したが、NGF による作用を阻害しなかった。これは膜電位依存型カルシウムチャネルを介した細胞外カルシウムの流入が MSH の突起伸長作用に必須であることを示唆しており、明らかに NGF の場合とは異なった特性であった。さらにカルシウムキレート剤である EGTA による細胞外カルシウムの除去は MSH による PC12 細胞の MAPK リン酸化を阻害したが、NGF による MAPK リン酸化には影響を与えなかった。以上の結果から MSH の PC12 細胞突起伸長作用は NGF の場合とは異なり、MAPK カスケードに至る上流で膜電位依存型カルシウムチャネルを介した細胞外カルシウムの流入¹⁷⁾が重要な役割を果たしていると考えられる。最近、PC12 細胞で L 型電位依存型カルシウムチャネルを活性化する S-(-)-BayK8644 や KCl が TrkA などのチロシンキナーゼ型受容体を介さずに MAPK のリン酸化を亢進し、突起伸長を誘導し、その作用が dominant-negative Ras の発現により抑制されることが報告されている¹⁸⁾。従って、これらの結果から MSH による突起伸長作用は図 12 に示した様に MSH がまず、細胞膜上の特異的な受容体と結合し、細胞外カルシウムの流入が生じ、PKC 及び Ras-MAPK カスケードを活性化することで誘導されていると考えられる。

Semaphorin 分子の受容体に関しては、最近、semaD の軸索伸長に対する反発作用に関与する受容体として neuropilin-1^{19,20)} と neuropilin-2²¹⁾ が同定された。PC12 細胞には neuropilin-1 と neuropilin-2 の mRNA が発現し、また、MSH が 293T 細胞に発現させた neuropilin-1 または neuropilin-2 に結合することから、MSH においても neuropilin-1 または neuropilin-2 を介して PC12 細胞の突起伸長を誘導する可能性が示唆されている（データ未発表）。

後根神経節ニューロンの軸索に対する sema D の反発作用は、cGMP 情報伝達系の活性化により誘引作用に変化する。また、反発作用と誘引作用はともに neuropilin-1 に対する抗体で阻害されたことから、両作用は同一受容体 neuropilin-1 を介した作用であると考えられている²²⁾。このようにニューロンの種類や細胞内の情報伝達系

によって、同一分子が同一受容体を介して異なった作用を及ぼすことが明らかになってきた。MSH に関しても、知覚神経の軸索に対して反発作用を示すことが報告されており²⁾、本研究において MSH が PC12 細胞に対し突起伸長作用を示すことが明らかになったことから、MSH が生体内において特定のニューロンに対して同一受容体 neuropilin-1あるいは neuropilin-2を介して反発作用以外に誘引作用を示す可能性が考えられ、今後の重要な研究課題である。

結語

知覚神経に対して反発作用を持つ MSH の新たな機能を解明するために、PC12 細胞に対する生物活性を検討した。

1. MSH が PC12 細胞の突起伸長を誘導することを見出した。
2. MSH による PC12 細胞の突起伸長作用の情報伝達機構は NGF の場合と同様に Ras-MAPK カスケード、PKC を介することを明らかにした。一方、NGF の場合とは異なり、MSH の PC12 細胞に対する突起伸長作用は電位依存型カルシウムチャンネルによる細胞外カルシウムの流入を必要とすることを明らかにした。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜った口腔外科学第一講座松矢篤三教授に心から謝意を表します。また、本研究は医学部保健学科神経生物学研究室稲垣忍教授の指導下で行われたものであり、稲垣教授に感謝致します。また、終始変わらぬ御指導を頂いた同研究室の大岡嘉治博士および国立中部病院附属長寿医療研究センター分子遺伝部室長古山達雄博士に感謝いたします。また、研究の円滑な進展のために特別の御配慮を頂きご協力下さいました口腔外科学第一講座および医学部保健学科神経生物学研究室の研究員の方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) 阪井丘芳、古山達雄、宮崎信雄 (1998) : レビュー ; セマフォリン分子群研究の展開. 免疫 Immunology Frontier (宮坂昌之編), 第 8 巻, メディカルレビュー社, 東京, 5-11, 平成 10 年.
- 2) Miyazaki, N., Furuyama, T., Amasaki, M., Sugimoto, H., Sakai, T, Takeda, N., Kubo, T. and Inagaki, S. (1999) : Mouse semaphorin H that inhibits neurite outgrowth from sensory neurons. *Neurosci. Res.* (in press).
- 3) Christensen, C. R. L., Klingelhofer, J., Tarabykina, S., Hulgaard, E. F., Kramerov, D. and Lukanidin, E. (1998) : Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-sema H, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res.*, 58, 1238-1244.
- 4) 浜口道成 (1992) : がん・増殖・分化の演出家チロシンキナーゼ. 実験医学バイオサイエンス, 第 6 巻, 羊土社, 東京, 114-115, 平成 4 年.
- 5) 菱木知郎, 中川原章 (1998) 神経成長因子のはたらき. 細胞増殖因子の作用と疾患 (宮園浩平編), 羊土社, 東京, 82-91, 平成 10 年.
- 6) Muroya, K., Hashimoto, Y., Hattori, S. and Nakamura, S. (1992) : Specific inhibition of NGF receptor tyrosine kinase activity by K-252a. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1135, 353-356.
- 7) McComb, R. B. and Bowers, G. N. Jr. (1972) : Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.*, 18, 97-104.
- 8) Doherty, P., Ashton, S. V., Moore, S. E. and Walsh, F. S. (1991) : Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca^{2+} channels. *Cell*, 67, 21-33.
- 9) Allesi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A.R. (1995) : PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 270, 27489-27494.
- 10) Kruttgen, A. K., Moller, J. C., Heymach Jr. J. V. and Shooter, E. M. (1998) : Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9614-9619.
- 11) Alonsio, M., Muniz, M., Hall, C., Velasco, A. and Hidalgo, J. (1998) : Calphostin C

- induces selective disassembly of the Golgi complex by a protein kinase C-independent mechanism. *Eur. J Cell Biol.* 76, 93-101.
- 12) Rasouly, D., Rahamin, E., Lester, D., Matsuda, Y. and Lazarovici, P. (1992) : Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of protein kinase C inhibition. *Molecular pharmacology*, 42, 35-43.
- 13) Stempka, L., Girod, A., Muller, H., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M. and Bossemeyer, D. (1997) : Phosphorylation of Protein Kinase C δ (PKC δ) at Threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. *J Biol Chem.*, 272, 6805-6811.
- 14) Pierceall, W.E., Cho, K.R., Getzenberg, R. H., Reale, M. A., Hedrick, L., Vogelstein, B. and Fearon, E. R. (1994) : NIH3T3 cells expressing the Deleted in Colorectal Cancer Tumor Suppressor Gene Product stimulate neurite outgrowth in rat PC12 pheochromocytoma cells. *J Cell Biol.*, 124, 1017-1027.
- 15) Yamada, M., Ikeuchi, H. and Hatanaka, H. (1997) : The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog. Neurobiol.*, 51, 19-37
- 16) Burry, R. W. (1998) : PKC activators (phorbol ester or bryostatin) stimulate outgrowth of NGF- dependent neurites in a subline of PC12 cells. *J Neurosci Res.*, 53, 214-222.
- 17) Rosen, L. B. and Greenberg, M. E. (1996) : Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 1113-1118.
- 18) Rusanescu, G., Qi, H., Thomas, S. M., Brugge, J. S. and Halegoua, S. (1995) : Calcium influx induces neurite growth through a src-ras signaling cassette. *Neuron*, 15, 1415-1425.
- 19) Takagi, S., Tsuji, T., Amagai T, Takamatsu, T. and Fujisawa, H. (1987) : Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 122, 90-100.
- 20) He, Z. and Tessier-Lavigne, M. (1997) : Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*, 90, 739-751.
- 21) Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M. (1997) : Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for

the semaphorins SemaE and SemaIV but not SemaIII. *Neuron*, 19, 547-559.

22) Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M. and Poo, M. (1998) : Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, 281, 1515-1518.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢篤三教授）

本論文に使用した略号を以下に示す。MSH ; Mouse semaphorin H, MSD ; Mouse semaphorin D, PC12 細胞 ; a clone derived from a pheochromocytoma tumor of the rat adrenal medulla (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株), NGF ; Nerve growth factor, EGF ; Epidermal growth factor, dBcAMP ; dibutyryl cyclic AMP, AP ; alkaline phosphatase, EDTA ; Ethylenediaminetetraacetate, EGTA ; [Ethylenebis (oxyethylenenitrilo)] tetraacetic acid, PBS (-) ; Ca²⁺, Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液, TBS ; Tris-buffered saline, FBS ; 牛胎児血清, BSA ; Bovine serum albumin, DMEM ; Dulbecco 変法 Eagle 最小必須培地, 293T ; human embryonic kidney cell line, SDS-PAGE ; ポリアクリルアミド電気泳動, PMSF ; phenylmethylsulfonylfluoride, PKC ; protein kinase C, DN ; dominant negative

図の説明

図1 MSHによるPC12細胞の形態的变化

MSH-AP (1 nM)、NGF (50 ng/ml)、AP (1 nM)、MSD 存在下で24時間培養したPC12細胞の位相差顕微鏡写真を示す。スケールは50 μmを示す。

図2 MSHによる突起伸長作用

PC12細胞をAP (1 nM)、MSH-AP (1 nM)、NGF (50 ng/ml) または、MSH-AP (1 nM) とNGF (50 ng/ml) 存在下にて24時間培養した。PC12細胞を観察し、突起伸長効果を評価した。グラフのX軸はPC12細胞に対する処理を、Y軸は突起伸長を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図3 MSH濃度依存性の突起伸長作用

PC12細胞をそれぞれの濃度のMSH-APまたはAPの存在下にて24時間培養した。グラフのX軸はPC12細胞に対して添加したAPとMSH-APの濃度を、Y軸は突起伸長を示す。(○)はPC12細胞に対してAPを、(●)はMSH-APを添加した結果を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図4 抗AP抗体を用いてのMSH-APの吸収による突起伸長作用への影響

MSH-AP発現NIH3T3細胞培養上清にマウス抗AP抗体セファロビーズを加え吸収させた後、ビーズを除いた培養上清をPC12細胞に作用させた。コントロールとしてはマウスIgGセファロビーズで吸収させた後、ビーズを除いた培養上清を用いた。グラフのX軸はそれぞれの培養上清を、Y軸はPC12細胞の突起伸長を示す。(□)はコントロールのマウスIgGで、(■)は抗AP抗体で吸収した培養上清での処理を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図5 MSHによる突起伸長作用に対するPD98059の効果

PC12細胞をPD98059で15分間処理した後、MSH-AP (1 nM)またはNGF (50 ng/ml) 存在下にてPD98059を添加したまま24時間培養した。グラフのX軸はPD98059

の濃度と、薬剤希釈時と同量の DMSO を示す。Y 軸は PC12 細胞の突起伸長を示す。

(○) は DMSO で 15 分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加し、(●) は PD98059 で 15 分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加した結果を示す。(□) は DMSO で 15 分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加し、(■) は PD98059 で 15 分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加した結果を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図 6 MSH による MAPK のリン酸化の検討

AP (1 nM)、MSH-AP (1 nM) または NGF (50 ng/ml) を添加して 0, 2, 5, 10, 30, 60 分後に PC12 細胞を回収後、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いたウェスタンブロッティングによりリン酸化 MAPK を検出した(1, 3, 5 段目)。同じ膜をリプローブして抗 MAPK 抗体を用い、MAPK が一定量であることを確認した(2, 4, 6 段目)。図左は処理に用いた AP、MSH-AP または NGF を示し、下はそれぞれの反応時間を示し、右はそれぞれ用いた一次抗体を示す。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

図 7 DN-*ras* 遺伝子産物発現による影響

A. PC12Ha XMV 細胞と PC12Ha RHK 細胞を MSH-AP (1 nM) または NGF (50 ng/ml) 存在下で 48 時間培養した位相差顕微鏡写真を示す。スケールは 50 μ m を示す。

B. 上記 A のように処理したそれぞれの PC12 細胞を観察し、24 時間後の突起伸長を評価した。(■) は PC12Ha XMV 細胞、(□) は PC12Ha RHK 細胞を示す。

(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図 8 MSH による突起伸長作用に対する TrkA 阻害剤の効果

A. PC12 細胞に下記の濃度の K-252a を作用させ、MSH-AP (1 nM) または NGF (50 ng/ml) 存在下で 24 時間培養した位相差顕微鏡写真を示す。スケールは 50 μ m を示す。

B. 上記 A. のように処理した PC12 細胞を観察し、突起伸長効果を評価した。

グラフの X 軸は K-252a の濃度と、薬剤希釈時と同量の DMSO を示す。Y 軸は PC12

細胞の突起伸長を示す。(○)はDMSOで15分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加し、(●)はK-252aで15分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加した結果を示す。(□)はDMSOで15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加し、(■)はK-252aで15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加した結果を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図9 MSHによる突起伸長作用に対するPKC阻害剤の効果

PC12細胞にコントロールDMSO、calphostin CまたはGö6983を作用させ、MSH-AP (1 nM) またはNGF (50 ng/ml) 存在下で24時間培養した。なお、calphostin CとGö6983の溶解液にはDMSOを用いた。グラフAのX軸はcalphostin Cの濃度と、薬剤希釈時と同量のDMSOを示す。Y軸はPC12細胞の突起伸長を示す。(○)はDMSOで15分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加し、(●)はcalphostin Cで15分間処理後MSH-AP (1 nM) を添加した結果を示す。(□)はDMSOで15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加し、(■)はcalphostin Cで15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加した結果を示す。ただし、calphostin Cは光照射が必要であるため、calphostin CまたはコントロールのDMSOで処理する際、蛍光灯で30分間光照射を行った。グラフBのX軸はGö6983の濃度と、薬剤希釈時と同量のDMSOを示す。Y軸はPC12細胞の突起伸長を示す。(○)はDMSOで15分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加し、(●)はGö6983で15分間処理後、MSH-AP (1 nM) を添加した結果を示す。(□)はDMSOで15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加し、(■)はGö6983で15分間処理後、NGF (50 ng/ml) を添加した結果を示す。(それぞれ平均値±標準誤差を示す)

図10 MSHによる突起伸長作用に対する電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤の効果

PC12細胞に下記の濃度のL型の電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤diltiazem (グラフA)、N型の電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤 ω -conotoxin (グラフB) をPBS (-) で各濃度に希釈後、PC12細胞に作用させ15分後経過後、MSH-AP (1 nM) ま

たは NGF (50 ng/ml) を添加し、培養した。24 時間後、PC12 細胞を観察し、突起伸長を評価した。それぞれ、X 軸は阻害剤の濃度、Y 軸は突起伸長を示す。

図 11 細胞外カルシウム除去による MSH の MAPK リン酸化に対する影響

PC12 細胞を 5 分間、2 mM または 5 mM の EGTA で処理後、NGF (50 ng/ml) : 1 ~3 列目、MSH-AP (1 nM) : 4~6 列目、AP (1 nM) : 7~9 列目または DMEM : 10 列目 で 5 分間作用させた PC12 細胞を回収し、SDS-PAGE で分離後、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりリン酸化 MAPK を検出した (1 段目)。同じ膜をリプローブして抗 MAPK 抗体を用い、MAPK が一定量であることを確認した (2 段目)。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

図 12 MSH による PC12 細胞の突起伸長における細胞内情報伝達機構

MSH による PC12 細胞の突起伸長には細胞外カルシウムが関与しており、未知のレセプターを介して、Ras-MAPK 系から核に情報が入ることが示唆された。

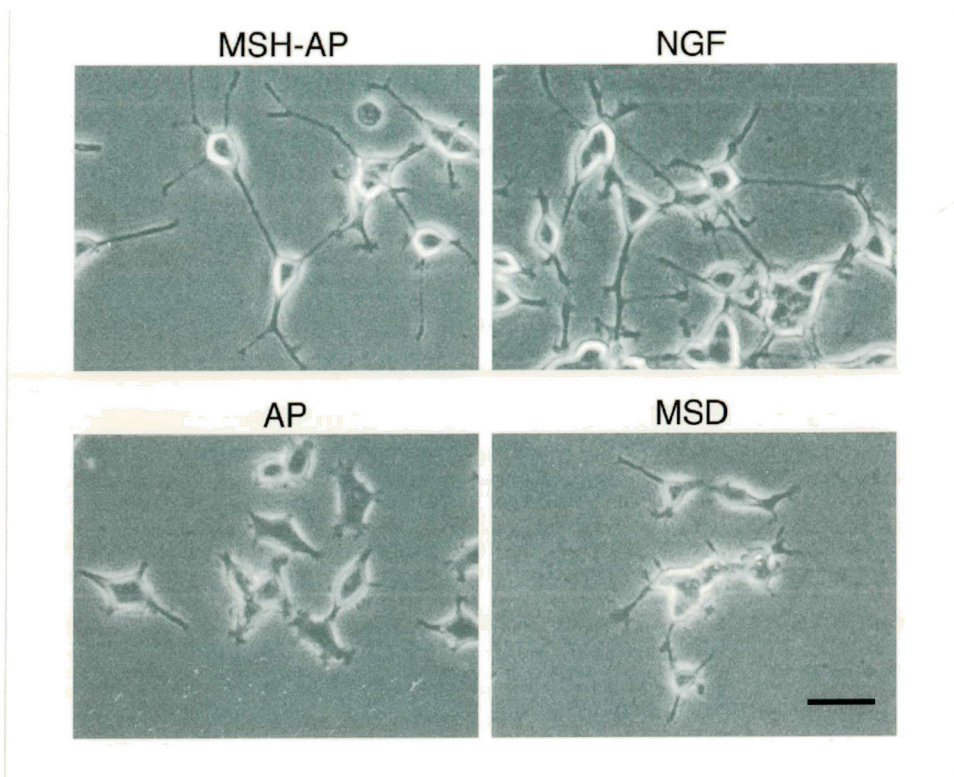


図 1

阪井 丘芳

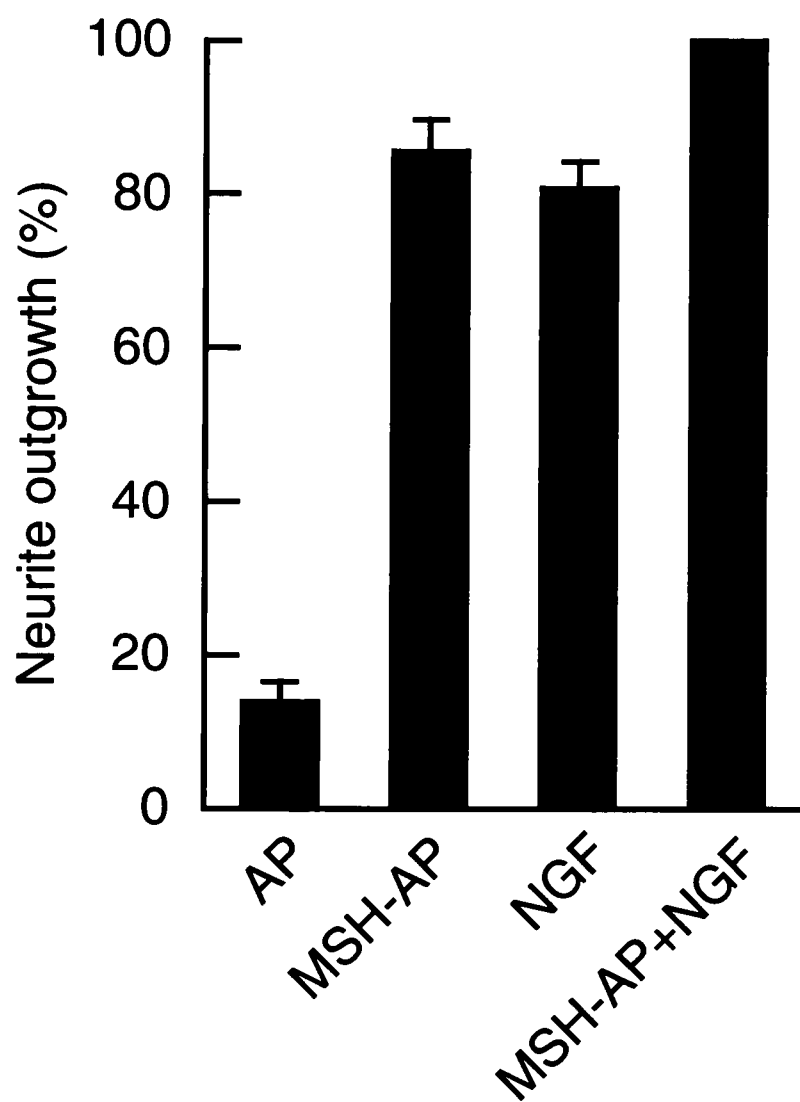


図 2

阪井 丘芳

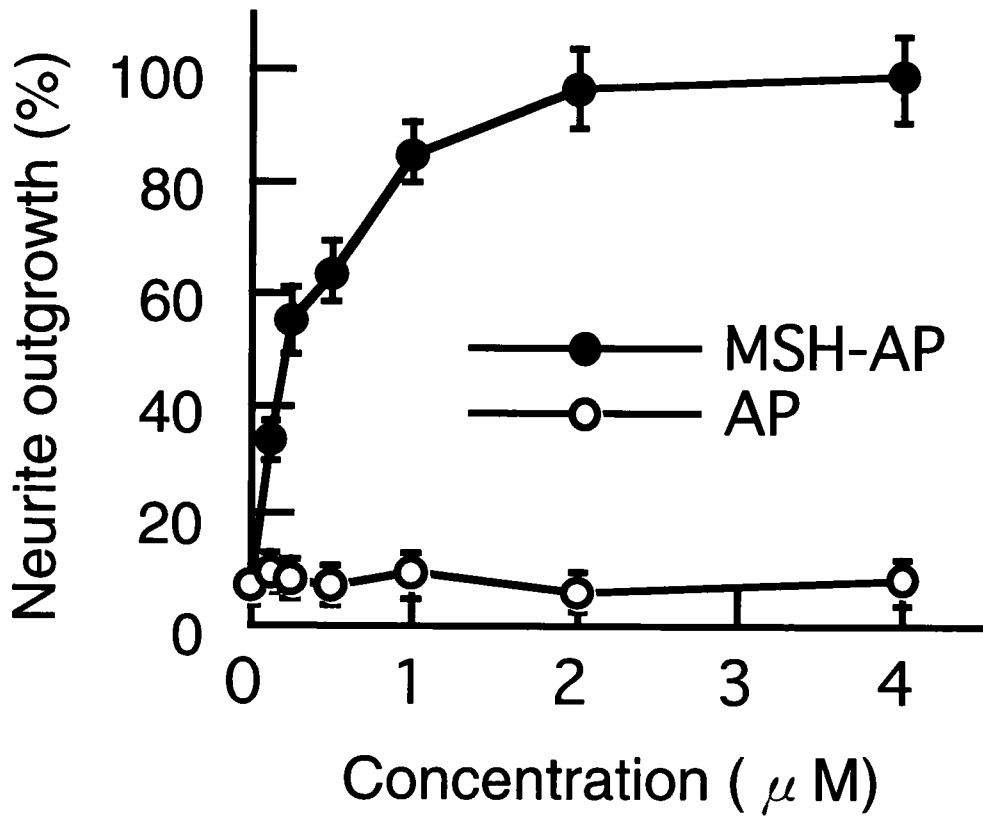


図 3

阪井 丘芳

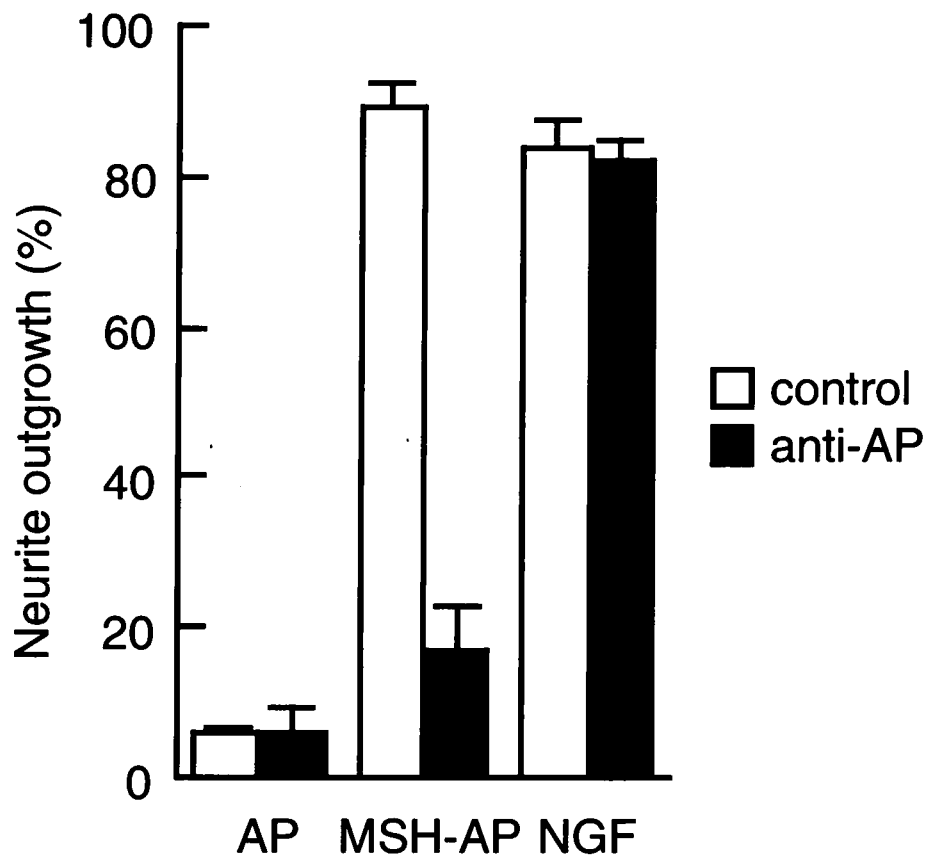


图 4

阪井 丘芳

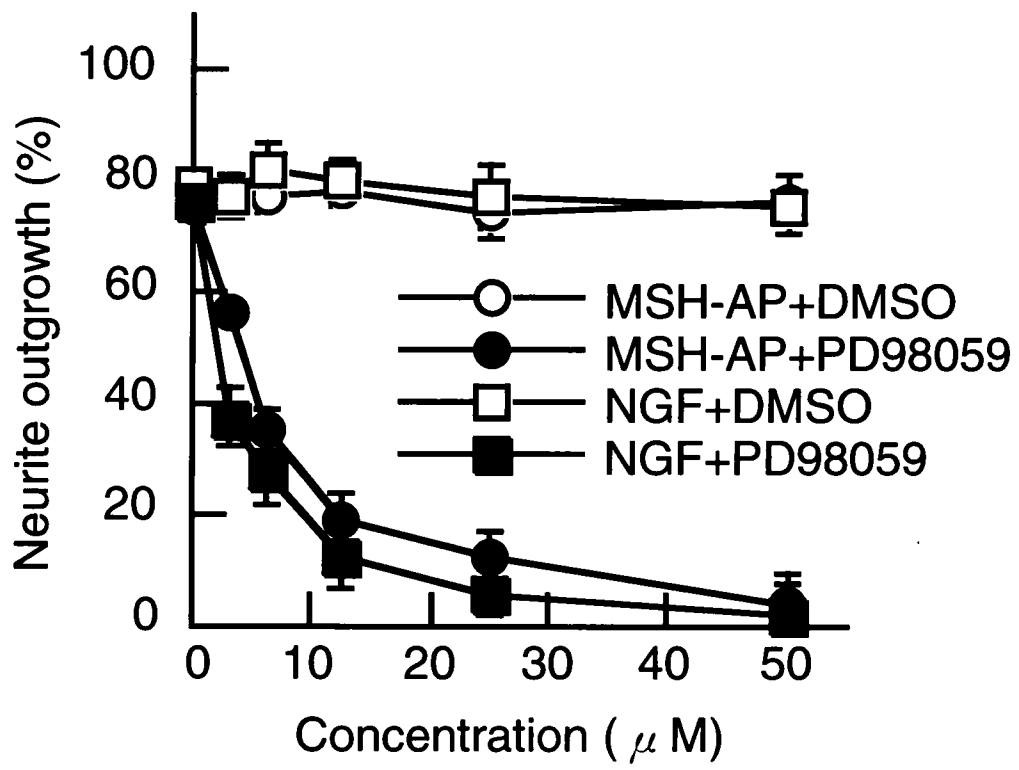


图 5

阪井 丘芳

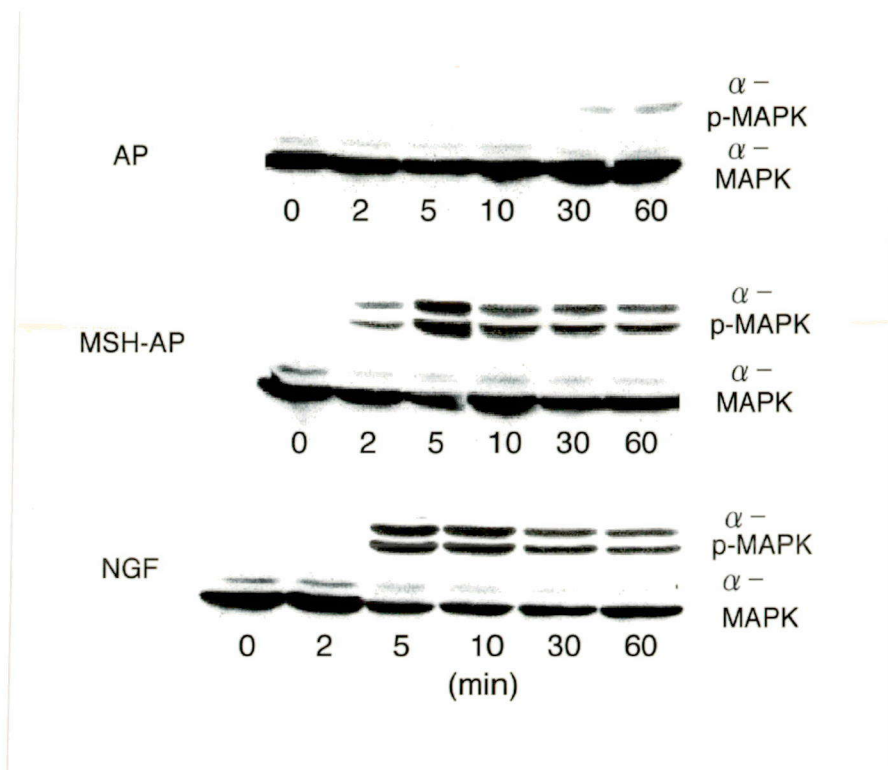


图 6

阪井 丘芳

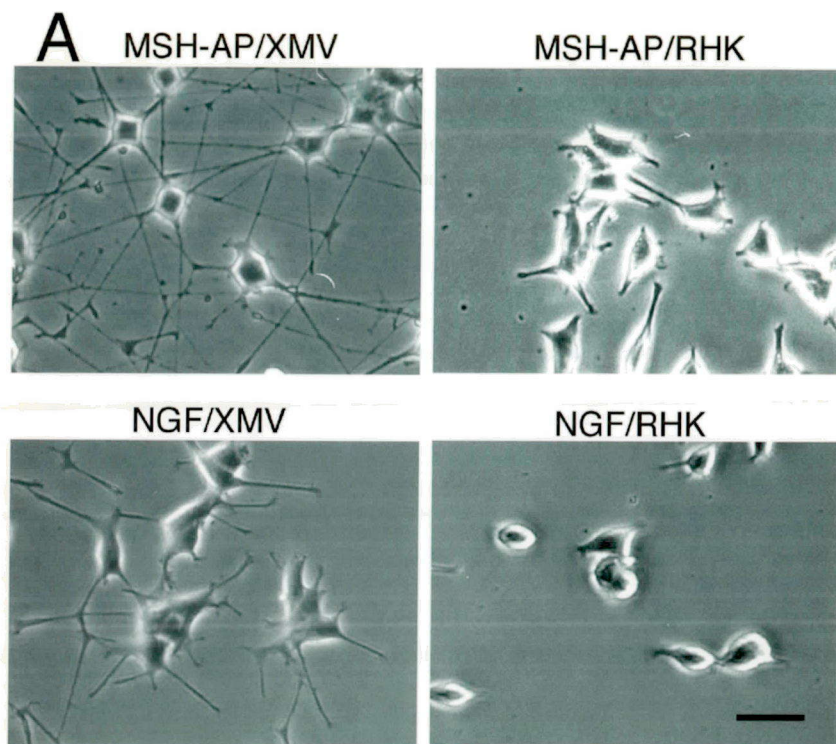


図 7A

阪井 丘芳

B

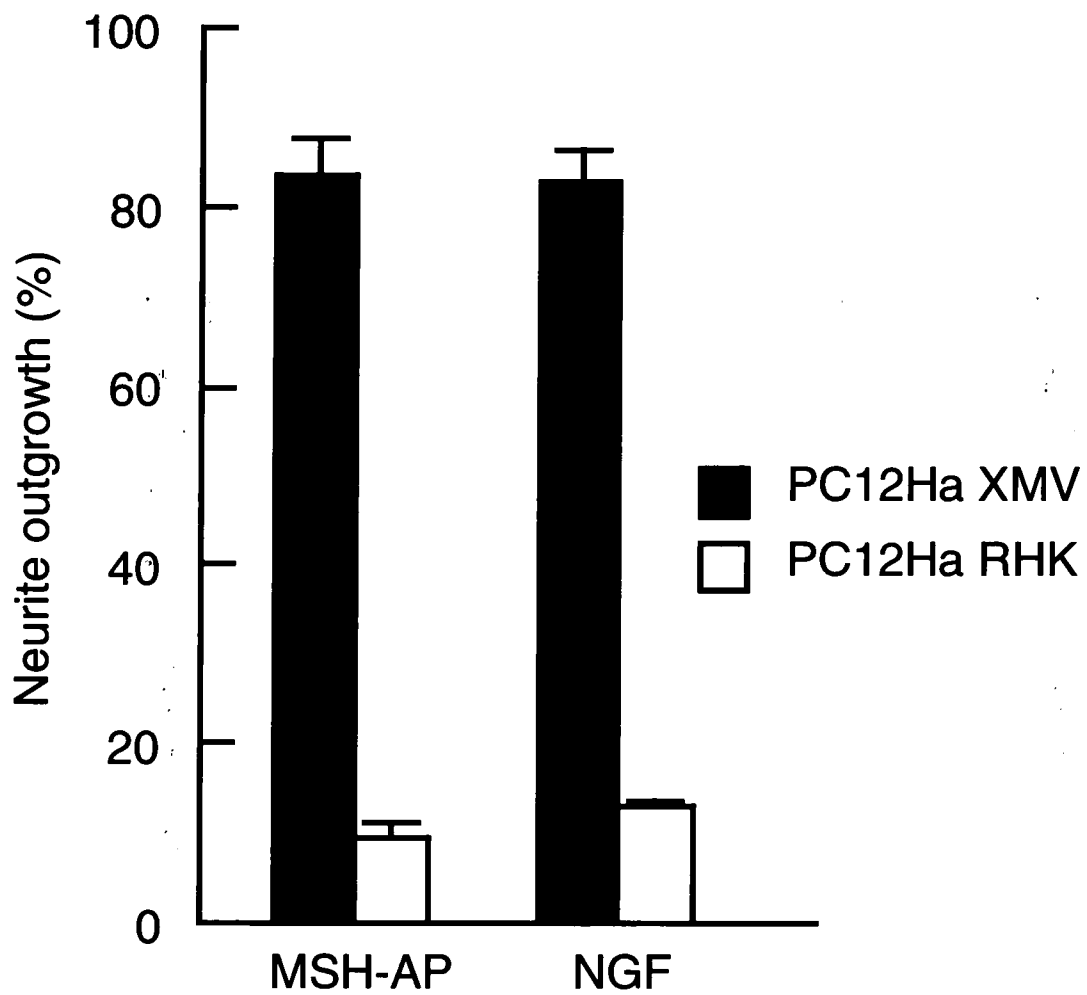


图7B

阪井 丘芳

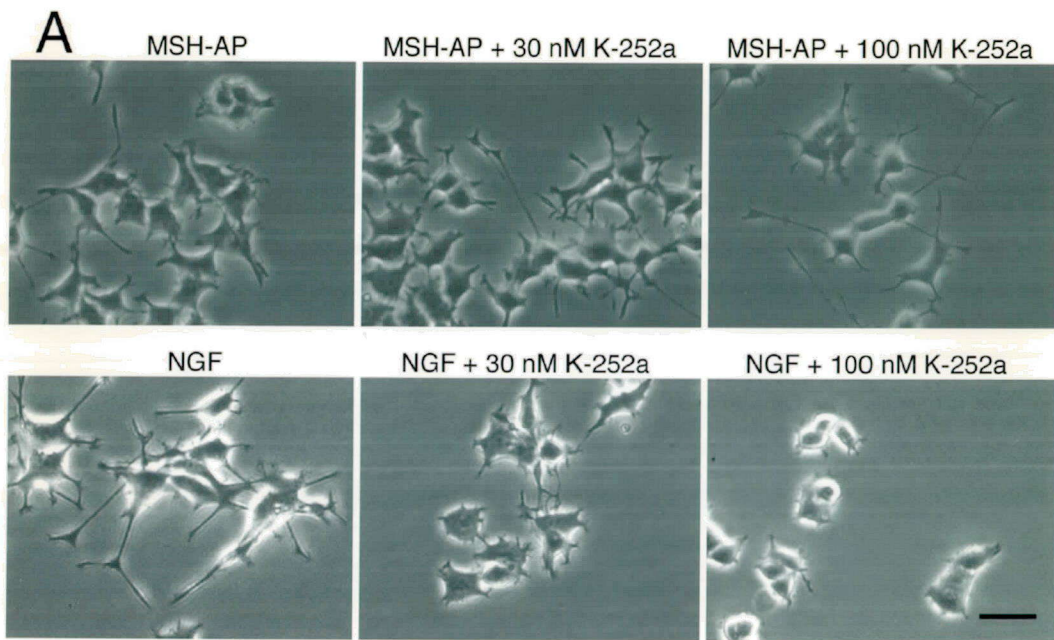


図 8A

阪井 丘芳

B

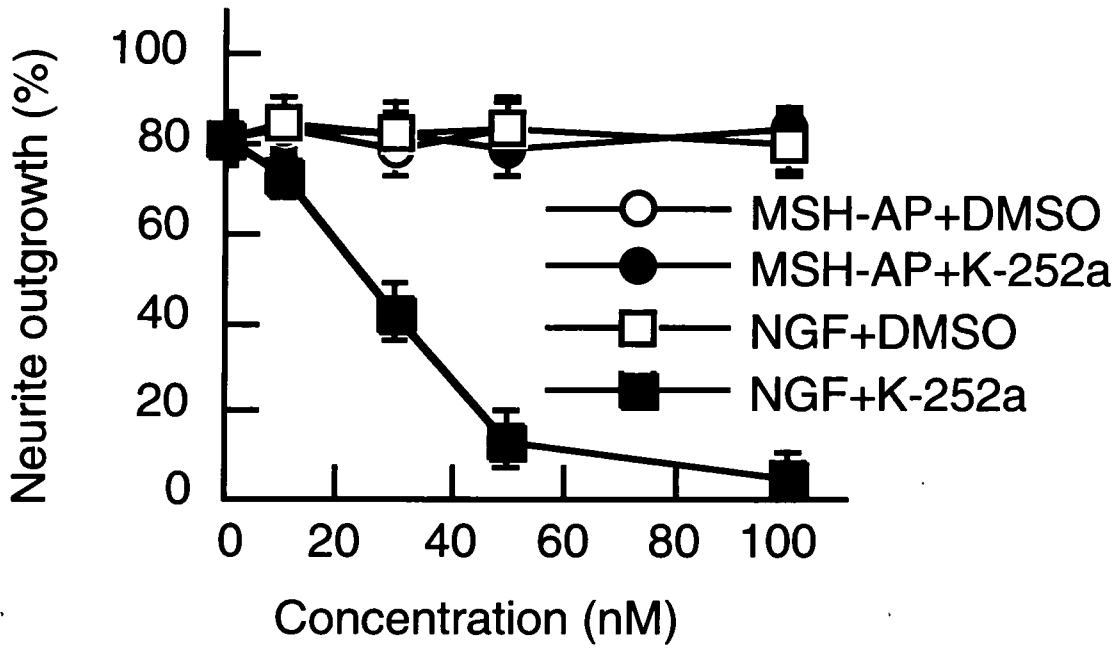


図8B

阪井 丘芳

A

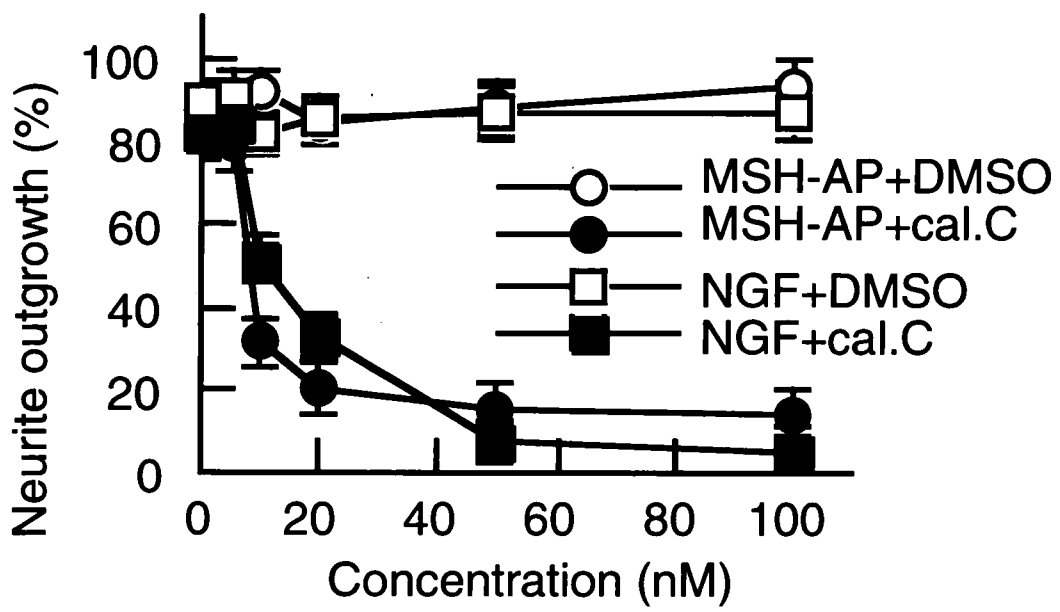


図9A

阪井 丘芳

B

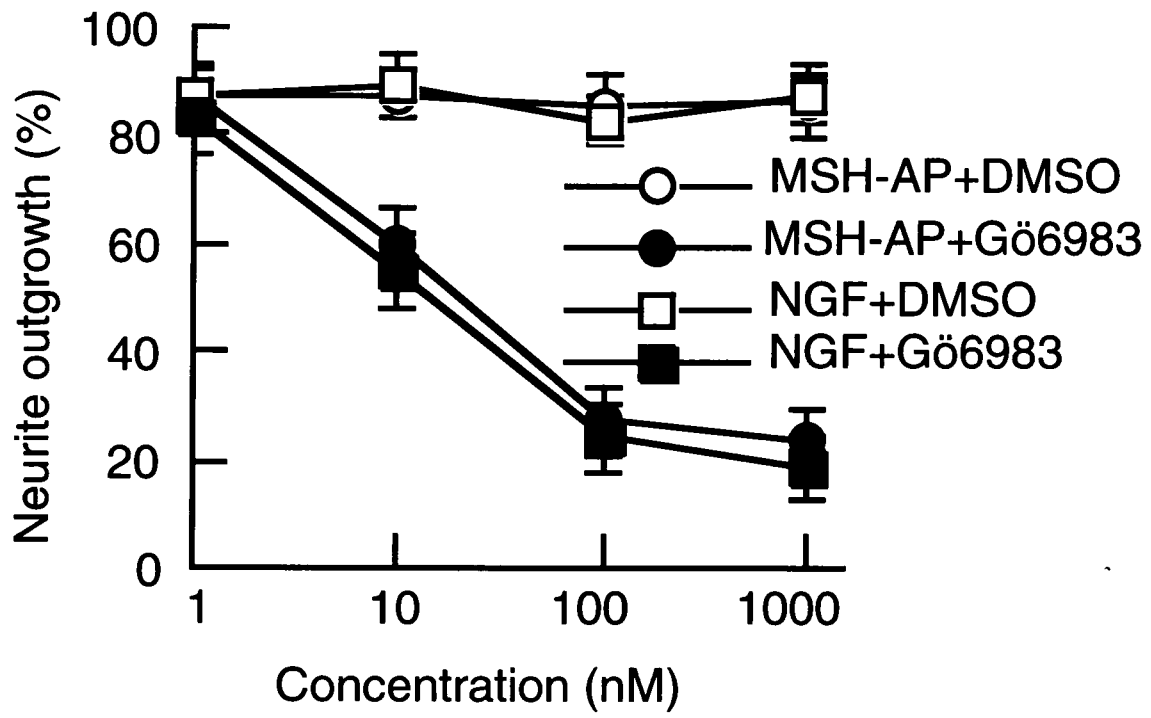


图9B

阪井 丘芳

A

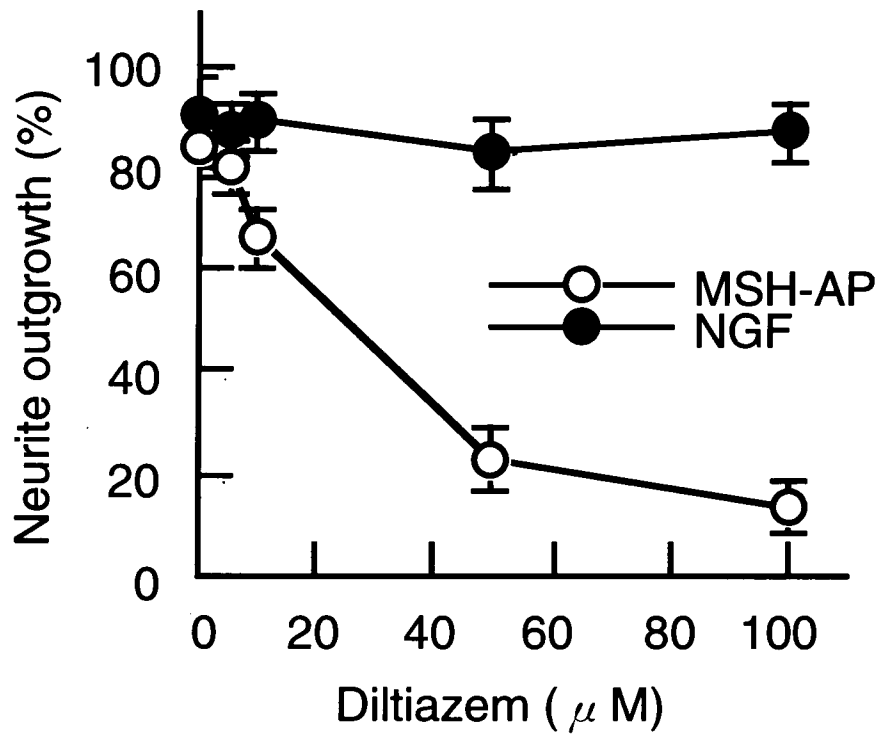


図10A

阪井 丘芳

B

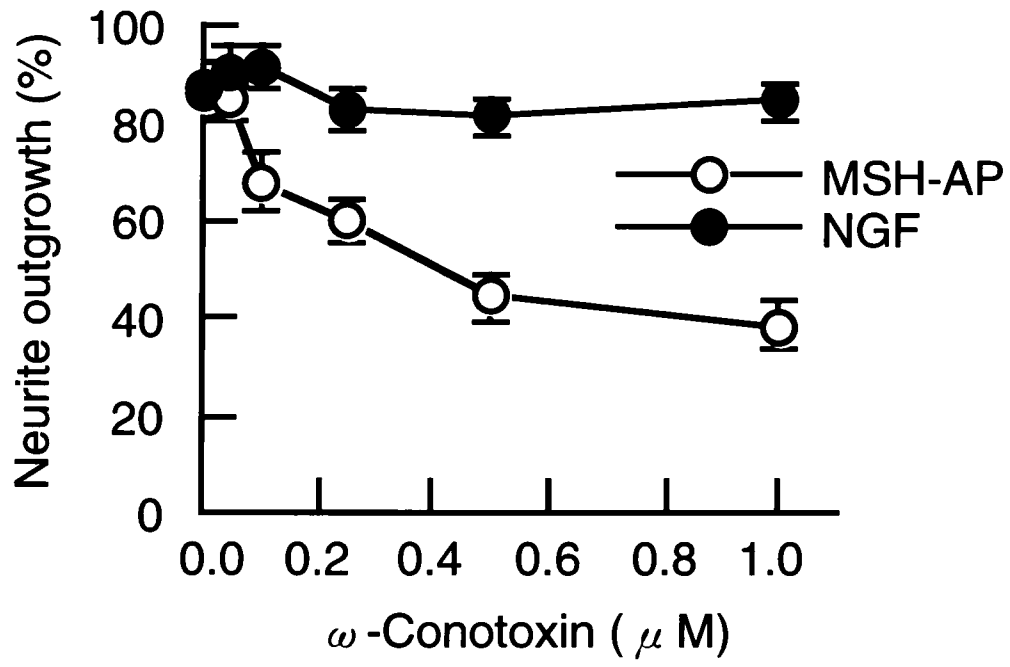


図10B

阪井 丘芳

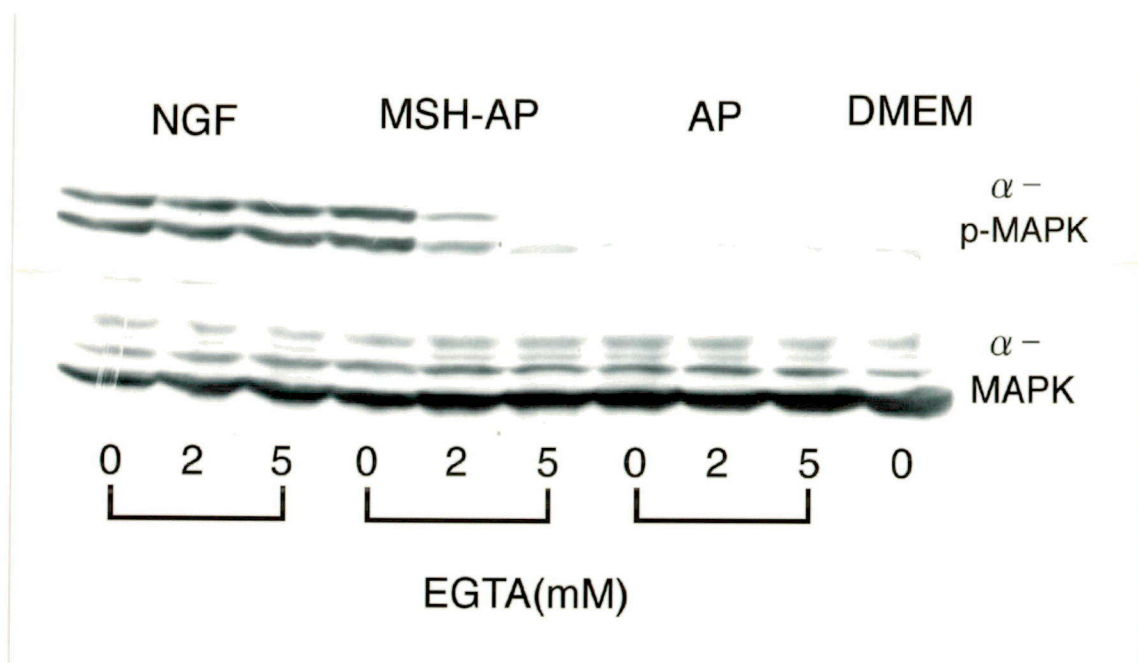


图 11

阪井 丘芳

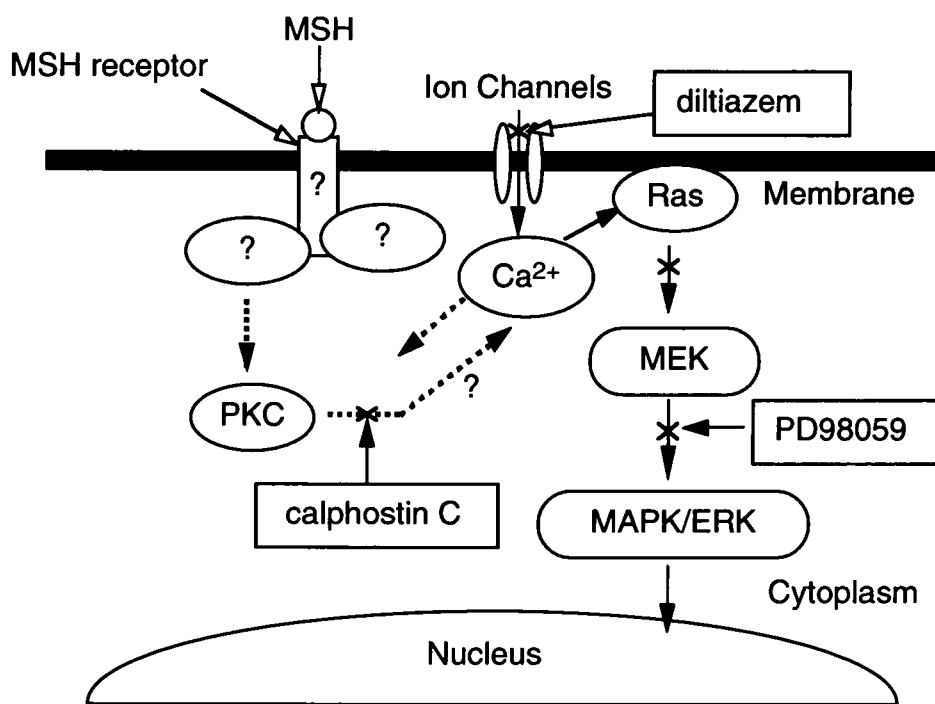


図12

阪井 丘芳