



Title	Difference in influence of resveratrol on undifferentiated and differentiated PC12 cells
Author(s)	早川, 直哉
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55743
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (早川 直哉)	
論文題名	Difference in influence of resveratrol on undifferentiated and differentiated PC12 cells (レスベラトロールの未分化及び分化PC12細胞に対する影響の違い)
論文内容の要旨	
<p><u>目的</u></p> <p>赤ワインなどに多く含まれる植物化学物質のポリフェノールの1種であるレスベラトロール (RSV) は正常細胞には保護的に作用し細胞生存に貢献するが、腫瘍/癌細胞には障害的に作用し細胞死を誘導すると考えられているため、寿命延長、老化抑制、癌治療等の観点から注目され、多くの解析が行なわれている。RSVはSIRTファミリータンパク質の活性化を介して酵母、線虫及びショウジョウバエなどの寿命を有意に延ばすことが報告されている。RSVの寿命延長効果はマウスなどではまだ確認されていないが、老化関連疾患の発症を遅延させるので、RSVはヒトの老化及び老化関連疾患を遅延させ健康寿命を延長させることが期待される。私たちの以前の研究において、老化促進マウスでのRSV投与で肝細胞のミトコンドリアの数が増加し、さらにミトコンドリアが老化肝細胞で増加する脂肪滴の周囲に密集し脂肪滴を減少させることができた。このことはRSVにより中性脂肪をミトコンドリアが消費し (β酸化) 、ATP合成を活性化させることを示唆する。さらにミトコンドリアに局在する活性酸素消去酵素であるSOD2の発現増加を確認した。SIRTタンパク質の発現ではSIRT1は有意な変化がなかったが、ミトコンドリア局在のSIRT3は有意に発現が増加した。このことから私たちはRSVによるミトコンドリアの活性化が細胞の機能亢進、延いては細胞老化抑制に重要であると考えている。従って、RSVの細胞における効果を明らかにするためには培養細胞を用いて解析することが必要となる。またRSVによってミトコンドリアと共にオートファジーの機能も亢進することが予想される。何故ならRSVはカロリー制限と類似の作用を示し、またオートファジーはカロリー制限によって促進されるので、RSVによるオートファジーの活性化の有無の解析は極めて注目されている。今回用いた培養細胞であるPC12細胞はラット褐色細胞腫の細胞株に由来する神経系の腫瘍細胞である。この細胞は本来腫瘍性であるが、NGF (神経成長因子) で処理すると神経細胞に分化するため、腫瘍細胞 (未分化) と神経細胞 (分化) の分化度の異なる性質を同一起源の細胞で解析する利点がある。本研究では、RSVの未分化及び分化PC12細胞における作用を主としてミトコンドリアとオートファジーの機能変化に注目し、細胞死・細胞生存とそれらに関連するタンパク質の発現変化を解析した。</p> <p><u>材料と方法</u></p> <p>PC12細胞を、1) イムノプロット法の解析には10 cmプラスチックディッシュで、2) 免疫細胞化学法の解析には24ウェルディッシュに設置された15mmのカバースリップ上で、3) 電子顕微鏡での解析には24ウェルディッシュで培養した。PC12細胞を分化型にする場合は50 ng/ml NGFで24時間処理した。その後すべての未分化と分化PC12細胞は1、10及び100μM量のRSVで48時間処理し、RSV未処理の細胞をコントロール (0μM) とした。死にかけ及び死んだ細胞の割合、神経突起をもつ細胞、個々の細胞からの神経突起の数及び突起の長さは位相差顕微鏡像で解析された。イムノプロット及び免疫細胞化学で用いた抗体は以下の通りである。抗ニューロフィラメントHタンパク質 (NF-H) 、抗シナプトフィジン (SY) 、抗AMP活性プロテインキナーゼ (AMPK) 、抗リン酸化AMPK (pAMPK) 、抗SIRT1、抗SIRT3、抗スーパーオキシドジスマスター2 (SOD2) 、抗Bcl-xL、抗Bax、抗LC3、抗ATP合成酵素βサブユニット (βサブユニット) 、抗GAPDH及び抗カテプシンD。イムノプロットではHRP標識二次抗体で処理後、免疫反応したタンパク質のシグナルはECLシステムを用いてフィルム上で可視化し、免疫細胞化学ではFITCの蛍光標識二次抗体で処理してレーザー顕微鏡で解析し、それぞれ定量化した。電顕標本作成では、PC12細胞を2%グルタルアルデヒド及び2%パラホルムアルデヒド0.1Mリン酸緩衝液で固定、1%四酸化オスミウム水溶液で後固定、2%酢酸ウラン水溶液で処理し、脱水後に樹脂に包埋した。1μmの厚さの切片に切り、トルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で細胞を観察後、PC12細胞の超薄切片は酢酸ウラン及びクエン酸鉛で染色し電顕観察後撮影した。それらの像を用いてPC12細胞の神経細胞体におけるミトコンドリアの分布密度と細胞当たりのオートファゴソームの数を算出した。</p>	

結果

未分化及び分化PC12細胞における細胞死の割合は、未分化細胞ではRSVの濃度依存的に増加し、分化細胞では10 μ Mまで変化がなかったが、100 μ Mで有意に増加した。生きている細胞の中で神経突起（長さが1 μ m以上の突起を神経突起とした）を形成した細胞は、未分化細胞では10 μ Mまで約30%、100 μ Mでは80%に達し、分化細胞では濃度依存的に増加し、100 μ Mではほとんどすべての細胞が神経突起を伸展させた。神経突起を形成する細胞1個当たりの神経突起の数は未分化細胞では変化がなかったが、分化細胞では濃度依存的に増加した。神経突起の長さは未分化細胞では有意差は無かったが、分化細胞では濃度依存的に増加した。免疫細胞化学的解析ではNF-Hは未分化細胞ではほとんど染色されなかったが、分化細胞では濃度依存的に染色が増強され、特に神経突起に線維状の強い反応が見られた。同様に、SYは未分化細胞ではほとんど染色されなかったが、分化細胞では有意に増加し、特に神経突起の先端で反応が強かつた。SOD2については免疫染色とイムノプロットの両手法で解析した。未分化細胞では染色はほとんど変化がなかったが、イムノプロットでは100 μ Mで発現が増加した。分化細胞では染色と発現共に濃度依存的に増加した。SOD2以外のイムノプロットによる解析において、未分化細胞で濃度依存的に発現が減少したものはSIRT1、Bax/Bcl-xL及びpAMPK/AMPKで、濃度依存的に増加したのはカテプシンDとSIRT3であった。分化細胞で濃度依存的に発現が増加したものはSIRT3とpAMPK/AMPKで、100 μ Mのみで増加したものはカテプシンD、変化がなかったのはSIRT1とBax/Bcl-xLであった。ミトコンドリアとオートファジーの変化については以下の通りであった。ミトコンドリアの分布密度は、未分化細胞では10 μ Mまで変化はなかったが、100 μ Mで有意に減少し、分化細胞におけるコントロール群のミトコンドリアの数は未分化細胞のコントロール群とほぼ同じで、RSV投与で濃度依存的に有意に増加した。ミトコンドリアATP合成酵素 β サブユニットの発現は未分化細胞では100 μ Mで有意に減少し、分化細胞では10 μ Mまで有意に増加した。オートファゴソームは未分化細胞ではコントロール群で多く、RSV投与で濃度依存的に減少したが、分化細胞のコントロール群では少なく、RSV投与で濃度依存的に増加した。LC3-IIの発現（LC3-II/LC3-I）は濃度依存的に未分化細胞では減少、分化細胞では増加した。未分化細胞のコントロール群と分化細胞のRSV処理群において、すなわちオートファジーが活性化している細胞でミトファジーが頻繁にみられた。RSV処理によるLC3-II/LC3-Iの増加はオートファゴソームの数の増加と一致した。

考察

PC12細胞を用いてのRSVの作用機序の一環として、今回の研究でRSVが細胞の分化度の違い、すなわち未分化と分化細胞でほぼ逆に作用することがわかった。この両細胞でのRSVの作用の相違で最も重要な所見はミトコンドリアとオートファジーの機能的相違で、未分化細胞ではこれらの機能が抑制され、分化細胞では促進されることを初めて見出した。PC12細胞が未分化な場合は、RSVはミトコンドリアとATP合成酵素の減少、オートファゴソームとLC3-II/LC3-Iの減少を引き起こした。すなわち、未分化PC12細胞において、RSVはSIRT3ではなく、SIRT1を抑制してAMPKを不活性化する。その結果、ミトコンドリアとオートファジーの機能を抑制し細胞死/アポトーシスを促進すると思われる。一方、PC12細胞が分化した場合、RSVは未分化の場合と逆に、ミトコンドリアとATP合成酵素を増加させ、さらにオートファゴソームとLC3-II/LC3-Iも増加させた。このことから、RSVは主にSIRT3を活性化し、AMPKの活性化さらにはSOD2の活性化につながると考えられる。その結果、ミトコンドリアとオートファジーの機能を活性化し、細胞分化を促進し細胞生存に貢献することが考えられる。以上より、一般的にRSVは未分化細胞、すなわち癌細胞などの危険な細胞においてはオートファジー機能を低下させミトコンドリアを不活性化することによって分化及び生存を抑制するが、分化細胞、すなわち神経細胞などの正常細胞においてはオートファジーの機能を促進させ、ミトコンドリアを活性化し神経突起伸展能などの構造的変化を含めその細胞に特異的なタンパク質の発現増加で示されるように細胞分化/細胞生存を促進すると推測される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (早川 直哉)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主査 教授 稲垣 忍
	副査 教授 三善 英知
	副査 教授 木原 進士
	副査 特任教授 松浦 成昭

PC12細胞は本来腫瘍性(未分化細胞)であり、NGF処理で分化させると神経性(分化細胞)になる。このPC12細胞の2つの異なる性質を利用して、レスベラトロール(RSV)の作用機序を、イムノプロット法、免疫細胞化学法、電子顕微鏡を用いて解析した。RSV未処理PC12細胞と比較して、3種類の異なる濃度のRSV(1、10、100μM)による有意な変化は以下の通りである。細胞死は、未分化細胞では増加、分化細胞では10μMまで変化がなかった。突起伸展能は未分化細胞ではみられなかったが、分化細胞では促進した。SIRT1の発現は未分化細胞では減少し、分化細胞では変化なかった。SIRT3の発現は両細胞共増加した。ミトコンドリアの数とそのATP合成酵素(βサブユニット)の発現は未分化細胞では100μMで減少、分化細胞では100μMを除き増加した。オートファゴソームの数とLC3-II/LC3-Iの割合は未分化細胞では減少、分化細胞では増加した。リン酸化AMPKの発現は未分化細胞では低下、分化細胞では促進した。以上より、RSVはSIRTファミリーの活性化の調節を通してAMPKの活性化を未分化細胞では抑制、分化細胞では促進し、それぞれミトコンドリアとオートファジーの機能の抑制あるいは促進を引き起こし、最終的に未分化細胞では細胞死を、分化細胞では細胞生存を誘導することが示唆された。

以上の結果から、ミトコンドリア機能とオートファジー機能について、RSVは未分化な細胞と分化した細胞では逆に作用することが明らかになった。一般的にRSVはがん細胞など未分化な細胞ではミトコンドリア機能とオートファジー機能を低下させることにより分化・生存を抑制することが報告されている。しかしながら、分化細胞では逆の作用を示し分化・生存を促進することを本論文で示すことができた。

本研究成果は未分化な細胞と分化した細胞では異なるRSVの作用を明瞭に示したものであり、国際的にも高く評価できることから、博士(保健学)の学位授与に値すると判断される。