

Title	細胞内局所温度の微細制御による温度シグナリングを介した神経分化機構の解明
Author(s)	中馬, 俊祐
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96405
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (中馬 俊祐)

論文題名

Elucidation of neuronal differentiation mechanisms by thermal signaling through control of intracellular local temperature
 (細胞内局所温度の微細制御による温度シグナリングを介した神経分化機構の解明)

論文内容の要旨

神経幹細胞はニューロトロフィン (Nerve Growth Factor: NGF) を代表とする分化因子によって神経突起を伸ばし、神経細胞へと分化する。神経分化は、発生過程や神経機能の再生のために重要なプロセスである。神経細胞の分化を誘導する機構は、様々な化学的シグナル伝達の他にも、熱刺激が報告されている。例えば、*in vitro*では、培養温度の調節による温度刺激が神経分化を引き起こすこと、*in vivo*では、胎児の神経発生期に母体と胎児の体温が上昇することが報告されており、神経分化における温度の関与が示唆されている。しかし、これまで研究では、細胞全体の加熱やヒートショック応答など外部熱源を用いており、神経分化における局所的な細胞内温度の変化や細胞がもつ内在性熱源による自発的な温度変化の機能については、不明である。そこで、本研究では、神経分化のモデル細胞であるPC12細胞を用いて、非侵襲的かつ生理学的な細胞内局所の温度上昇が神経分化に及ぼす影響を調べるとともに、神経分化において局所的な細胞内の温度変化を調べることで、細胞内温度が関与する新規の神経分化機構を調べた。

PC12細胞は、NGFによって神経分化が誘導され、神経突起を伸ばし、神経細胞と同様の分化マーカーを発現する。細胞内温度の測定には、温度上昇に伴い蛍光寿命が長くなる温度感受性蛍光プローブ(Fluorescence polymeric thermometer: FPT)と、蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた。また、細胞内の微細な温度操作には、赤外レーザー照射により定量的な細胞内の局所加熱を行った。

神経分化時に赤外レーザーによる定量的加熱を用いた局所温度 (特に核内) の上昇 ($\Delta T = +2, 3, 5 \text{ } ^\circ\text{C}$) により、非加熱細胞よりも核内加熱した細胞の方が神経突起の伸長がおおよそ1.5倍促進された。加熱条件の検討から、 $\Delta T = +3 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、30分の核加熱が最も効率的に神経突起伸長を促進することがわかった。次に、神経分化時に内在的に細胞内で温度変化が起きるか調べるために、神経分化前後で細胞内の温度を測定した。細胞内温度測定から、神経細胞の分化は、転写と翻訳に関連した自発的な細胞内温度上昇を伴っていることが明らかになった。神経分化時の細胞内温度の局所の上昇が神経突起伸長に必須であるか調べるために、熱吸収ポリマー (過剰量のFPT) を用いて、細胞内温度の局所の上昇を抑制した。神経細胞分化における細胞内温度上昇の抑制は、神経突起伸長を抑制した。さらに、自発的な細胞内温度上昇は、マウス初代大脳皮質ニューロンの神経突起伸長にも関与していた。

本研究から、神経分化時に転写、翻訳などの細胞内反応由来の自発的な細胞内の温度上昇が見られたこと、細胞内の温度上昇が神経突起伸長を駆動していることが明らかとなった。以上の結果から、神経分化時に自発的な細胞内の温度上昇が劇的な形態変化である神経突起伸長に貢献するという細胞内温度シグナルによって誘導される新規の神経分化機構モデルを提唱する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中馬 俊祐)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 原田 慶恵
	副 査	教授 上田 昌宏
	副 査	教授 石谷 太

論文審査の結果の要旨

神経幹細胞から神経細胞への分化は、神経突起の伸長を含む複雑なプロセスである。最近の研究では、化学的シグナル伝達の他に、熱刺激が神経細胞分化に影響を与える可能性が示唆されているが、細胞内温度の具体的な役割はまだ十分に理解されていない。そこで、中馬氏は神経分化のモデル細胞である PC12 細胞を用いて、分化過程における細胞内温度の観察と、細胞内温度を定量的に微細に制御する方法を用いて、細胞内温度が関与する神経分化機構を調べた。

PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) によって分化が誘導され、神経細胞特有な突起を伸ばした形に変化する。細胞内温度の測定には、温度上昇に伴い蛍光寿命が長くなる蛍光高分子温度計と、蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた。また、細胞内の温度操作には赤外レーザーを用いて、定量的な細胞内の加熱を行った。

まず、細胞内温度上昇の細胞分化への関与を調べるため、NGF による分化誘導時に核内を赤外レーザーで培養温度よりも数度温度が上昇するように 1 時間加熱した。その結果、非加熱細胞に比べ核内加熱細胞の神経突起の長さは 1.5 倍長くなった。加熱条件の検討の結果、NGF 添加直後に培養温度より 3 °C 上昇するように 30 分間核を加熱する条件が最も効率的に神経突起伸長を促進した。

次に、分化に伴う細胞内温度変化を調べた。未分化の細胞と比較して NGF により分化誘導された細胞では、細胞内温度が約 1.0~1.5°C 上昇した。この温度上昇がどの細胞内反応に因るものか調べるため、阻害剤 (Actinomycin D、Cycloheximide、Cytochalasin D) を用いて転写、翻訳、アクチン重合反応を阻害し、分化を抑制した際の細胞内温度の変化を調べた。その結果、転写や翻訳の抑制により細胞内温度は著しく低下した。さらに、分化時の細胞内温度上昇を吸熱ポリマーによって抑制すると、神経突起の伸長が著しく阻害された。この吸熱による神経突起伸長阻害は核内を赤外レーザーで加熱することで、回復した。

最後に、マウスの初代培養神経細胞を使用して神経分化時の細胞内温度の計測と、吸熱ポリマーによる神経突起伸長の抑制実験を検証した。マウスの初代神経培養細胞でも PC12 細胞同様、神経突起が伸長する際に細胞内温度が自発的に上昇し、この温度上昇を吸熱ポリマーによって抑制することで、突起の伸長が阻害された。

以上の実験から、中馬氏は神経分化の過程において、細胞内温度の変動が神経分化および神経突起の伸長に密接かつ相互的に関連していることを明らかにした。また、転写や翻訳反応による細胞内の自発的な発熱が、温度シグナルとして神経分化に寄与していること、さらに、マウスの初代培養神経細胞を用いた実験結果から、温度シグナリングを介した神経分化の制御が生体内でも起きていることを示唆する重要な知見を得た。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。