

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

博士論文

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

Elucidation of neuronal differentiation mechanisms by thermal signaling
through control of intracellular local temperature

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻

中馬 俊祐

目次

略記一覧

1. 要旨
2. 序論
 - 2-1. 神経細胞および神経分化について
 - 2-2. 神経分化における物理的なシグナルの影響
 - 2-3. 神経分化における温度応答に関するこれまでの研究の問題点
 - 2-4. 細胞内温度が関与する生命現象
 - 2-5. 本研究の概要
3. 実験材料および方法
 - 3-1. 培地・試薬の調製
 - 3-1-1. 培養培地の調製
 - 3-1-2. 分化用培地の調製
 - 3-1-3. 観察用培地の調製
 - 3-1-4. 血清の非働化
 - 3-1-5. 1 M HEPES-KOH (pH7.4)の調製
 - 3-1-6. Nerve Growth Factor (NGF)の調製
 - 3-1-7. 0.1 M ホウ酸バッファー(pH8.5)の調製
 - 3-1-8. Dextarn Texas Red (TR-Dex (D1828、Thermo Fisher))溶液の調製
 - 3-1-9. マイクロインジェクション溶液の調製
 - 3-2. Fluorescence Polymeric Thermometer (FPT)溶液の調製
 - 3-3. 細胞培養
 - 3-3-1. PC12 細胞の凍結ストック起こし
 - 3-3-2. PC12 細胞の継代
 - 3-3-3. PC12 細胞の凍結保存
 - 3-3-4. 実験で使用した細胞サンプルの調製
 - 3-4. PC12 細胞の分化
 - 3-5. マイクロインジェクション法
 - 3-6. 共焦点蛍光顕微鏡(TCS-SP8)による細胞観察
 - 3-6-1. 蛍光寿命測定顕微鏡(FSIM)について
 - 3-6-2. 共焦点蛍光顕微鏡(TCS-SP8)による蛍光寿命イメージングについて

- 3-6-3. TCS-SP8 共焦点顕微鏡を用いた細胞観察
- 3-6-4. FLIM(TCS-PC)を用いた細胞内 FPT の蛍光寿命測定
- 3-6-5. SymphoTime64 による蛍光寿命解析
- 3-6-6. 神経突起伸長の計測
- 3-7. 赤外(IR)レーザーによる局所加熱
 - 3-7-1. IR-LEGO (Infrared Laser-Evoked Gene Operator)について
 - 3-7-2. IR レーザーの照射点合わせ
 - 3-7-3. IR レーザーの照射
- 3-8. Fluorescent nanodiamond (FND) の表面修飾と細胞内温度測定
- 3-9. 細胞内反応の阻害
- 3-10. マウス初代大脳皮質ニューロンの調製
- 3-11. MAP2 の免疫蛍光染色イメージング
- 3-12. 統計解析
- 4. 結果
 - 4-1. PC12 細胞の NGF による分化誘導に伴う神経突起伸長と分化マーカーの発現
 - 4-2. 本研究で用いた細胞内温度計測と局所加熱について
 - 4-3. 細胞内温度計測を用いた IR レーザーによる局所的な細胞内加熱の定量化
 - 4-4. NGF による神経分化過程における細胞内局所加熱による神経突起伸長の促進
 - 4-5. NGF 非存在下での細胞内局所加熱による神経突起伸長の誘導
 - 4-6. 神経分化過程における細胞内温度上昇
 - 4-7. 神経分化時の細胞内温度上昇における細胞内反応の関与
 - 4-8. NGF による神経分化過程での細胞内温度上昇抑制による神経突起伸長の阻害
 - 4-9. マウス大脳皮質初代ニューロンの神経突起伸長における温度シグナルの寄与
- 5. 結論と今後の展望
 - 5-1. 結果まとめ
 - 5-2. 本研究の新規性
 - 5-3. 本研究の考察および展望
- 6. 参考文献
- 7. 謝辞

略記一覽

NGF: Nerve growth factor

FPT: Fluorescence polymeric thermometer

PC12: Pheochromocytoma-12

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A

IR: Infrared

MAP2: Microtubule-associated protein 2

FND: Fluorescent nanodiamond

ODMR: Optically detected magnetic resonance

TR-Dex: Texas Red-labeled dextran

PEI: Polyethyleneimine

ActD: Actinomycin D

CHX: Cycloheximide

CytD: Cytochalasin D

CP: Control copolymer

DIV: days in vitro

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS: Fetal Bovine Serum

HS: Horse Serum

PLL: Poly-L-Lysine

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

NVC: Nitrogen vacancy center

CW: continuous wave

MEM: Minimum Essential Medium Eagle

1. 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。さらに、細胞内の温度上昇が線虫の胚発生パターンを変化させる報告もあり、細胞内の温度の重要性も注目されている。

しかし、これまで神経分化についての研究では、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細胞内の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を用いて、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。

2. 背景

2-1. 神経細胞および神経分化について

神経細胞は神経幹細胞から分化した細胞である¹。神経細胞は分化の過程で劇的な形態変化（神経突起の伸長）を伴い、その後、神経としての機能を獲得する^{2,3}。神経分化は発生過程における脳の構築にとって必須であるだけでなく、それに伴う神経機能の再生は、さまざまな脳疾患や損傷の治療に応用できる可能性がある。そのため、神経分化の複雑なメカニズムは、長い間、盛んに研究されてきた⁴⁻⁶。

これまでの集中的な研究により、神経分化の根底にある複雑な分子メカニズムが明らかになってきた。例えば、神経分化は、神経成長因子（NGF）に代表されるニューロトロフィンなどの細胞外因子によって誘導され、様々な化学シグナル伝達経路を活性化する。NGFは親和性が異なる二つの受容体と結合し、シグナル伝達経路を活性化する。高親和性 NGF 受容体である TrkA (Tropomyosin receptor kinase A)の活性化は、RAF/ mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2) / extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) シグナル伝達経路を刺激し、転写を活性化する⁷。さらに、TrkA の活性化は、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介する AKT 経路を通じて、翻訳活性化を含む複数の細胞効果をもたらす⁸。低親和性 NGF 受容体 p75 は、nuclear factor κ B (NF- κ B) を介して転写を誘導する。このように、これらのシグナル伝達経路は分化する神経幹細胞において転写と翻訳を活性化し、アクチン重合^{9,10}、微小管合成¹¹、を経て神経突起伸長^{12,13}を誘導する。

2-2. 神経分化における物理的なシグナルの影響

上記に記載した化学的なシグナル機械的な力^{14,15}、電場^{16,17}、光¹⁸⁻²¹、温度²²⁻²⁹などの物理的なシグナルも、神経細胞の分化に影響を与えることが報告されている。特に、生物学的リズム（概日リズム³⁰や月経周期³¹など）による深部体温の変化（1°C未満）よりも大きな自発的な温度変動が脳で起こること^{32,33}や、妊娠初期の胎児の神経発生期に母体と胎児の体温が自律的に上昇することが報告されている³⁴。これらの体温の自発的な温度変動は、体温と脳機能との間に深い関係があることを示唆している。近年、神経突起伸長と温度との関係が研究され、熱刺激（ヒートショックなど）が神経突起伸長を誘導することが示されている^{23-25,28}。さらに、神経突起の伸長方向（すなわち軸索誘導）は、細胞外の加温によって影響を受ける^{26,27}。

2-3. 神経分化における温度応答に関するこれまでの研究の問題点

温度刺激による神経細胞分化誘導に関する上記に示した研究では、主に培養液全体または細胞外近傍の温度を操作するものであった。これらの方法では、細胞全体が加熱されるか、

熱源が細胞外にあるため、局所的な温度変化（核や細胞質など）に対する細胞の反応や、分化過程における細胞内在性の局所的な温度変化を理解することはできない。従って、細胞内温度が関与する神経細胞分化のメカニズムは不明である。

2-4. 細胞内温度が関与する生命現象

細胞内の温度測定や微細な温度操作の難しさから、細胞内温度が関与する神経細胞分化機構は不明であるが、細胞内温度測定技術の進歩により、個々の細胞の核や細胞質などの細胞内の領域に依存した温度変化が解明されるようになった³⁵⁻³⁸。さらに、脳組織³⁹や神経細胞^{40,41}における刺激応答性の細胞内温度変化も、それぞれの機能と関連している。このことは、局所的な細胞内温度の変化が、温度シグナル伝達機構として、温度に関連した神経分化の制御に重要である可能性が高いことを示唆している⁴²。実際、細胞内温度計測技術によって定量化された非侵襲的な細胞内加熱による細胞機能の制御が神経細胞機能も含めて報告されている⁴³⁻⁴⁵。

2-5. 本研究の概要

本研究では、神経細胞様 PC12 細胞における NGF 依存性の神経突起伸長に注目し、この神経分化現象に対する温度上昇の影響を調べた。まず、赤外（IR）レーザー照射を用いて PC12 細胞を局所的かつ定量的に加熱し、核内の生理学的な温度上昇が神経突起伸長を促進することを示した。次に、2つの異なる細胞内温度計を用いて、神経細胞分化の過程で、核内の転写と細胞質内の翻訳に依存する自発的な温度上昇を見出した。さらに吸熱ポリマーにより、この神経分化時の自発的な温度上昇を抑制することで、神経突起伸長を阻害することができた。神経突起伸長時の自発的な温度上昇と吸熱ポリマーによる神経突起伸長の抑制実験は、マウスの大脳皮質からの初代培養細胞でも確認することができた。これらの知見に基づき、自発的な温度上昇が神経突起伸長に寄与するという、温度シグナリングを介した神経細胞分化メカニズムの新しいモデルを提案した。

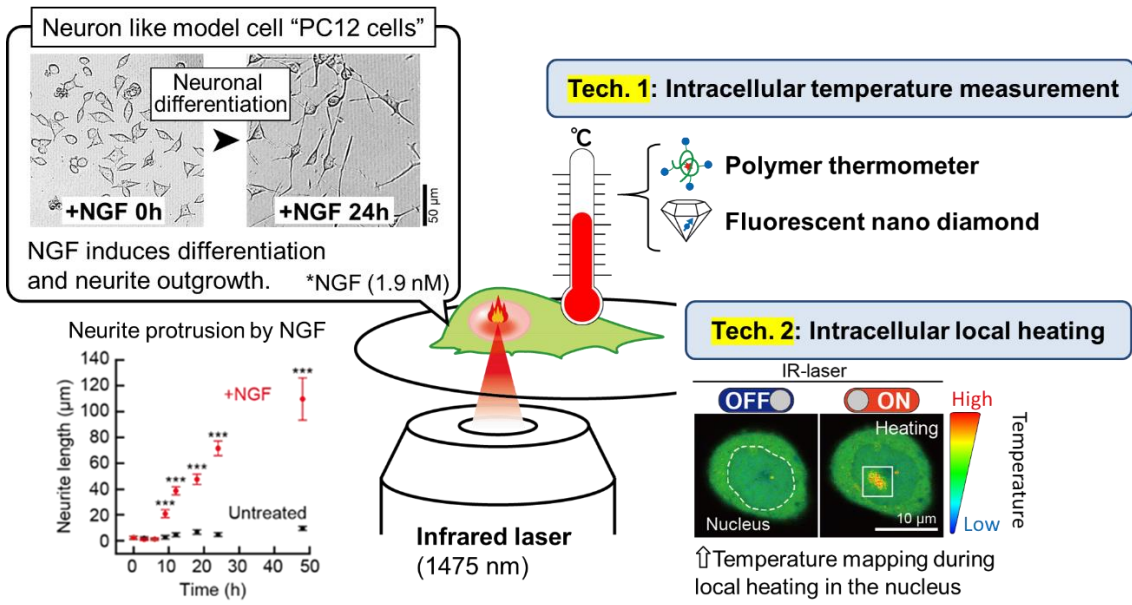


図 1. 本研究の概要

3. 実験材料および方法

以下に、本実験で用いた試薬・器具および装置を示す。

試薬・器具名	メーカー
1. ディッシュ	
Cell Culture Dishes (60×15 mm)	FALCON
Thissue Culture Dishes (100×20 mm)	TPP
ガラスボトムディッシュ 35mm No1S 14mmφ PLL	松浪硝子
2. ピペット・チューブ	
2 mlディスプレイザブルピペット	SUMILON
5 mlディスプレイザブルピペット	SUMILON
10 mlディスプレイザブルピペット	SUMILON
25 mlディスプレイザブルピペット	SUMILON
1.5 mlチューブ	WATSON
500 μlチューブ	WATSON
5 mlチューブ	
3. 培地	
DMEM培地 (Code: D6429)	SIGMA
DMEM培地 (Code: 21063-029)	gibco
4. 血清・抗生物質	
Horse Serum (Specialty Origin: NewZealand)	gibco
Fetal Bovin Serum (French origin)	biowest
Penicillin-Streptomycin, Liquid 100mL	Life technologies
5. その他の試薬	
KCl (Code: 28538-75)	nacalaitesque
NaCl (Code: 191-01665)	和光純薬工業
KH ₂ PO ₄ (Code: 164-04295)	和光純薬工業
K ₂ HPO ₄ (Code: 28538-78)	和光純薬工業
H ₃ BO ₃ (Code: 05215-05)	nacalaitesque
KOH (Code: 168-21815)	和光純薬工業
HEPES (Code: 346-08235)	同仁化学研究所
DMSO (CodeD2650-5X5ML)	SIGMA
PBS (Code: 27575-31)	nacalaitesque
BSA (Code: A-6003)	SIGMA
Nerve Growth Factor 2.5S (>95%)	alomone labs
Dextran Texas Red (Code: D1828)	Thermo Fisher
Cell Banker	
6. その他の器具	
Ultra free - MC 遠心式フィルターユニット (Code: UFC30GV25)	Millipore
150 ml ボトルフィルターシステム 0.22 μm (CA) (Product: 431154)	Corning
血球計算盤 (Burker-Turk)	Blight-Line
BICELL	日本フリーザー
CoolCell LX cell freezing container	Corning
マイクロインジェクション用Femtotips II	eppendorf

使用機器	メーカー
1. クリーンベンチ	
MCV-131BNF	三洋電機株式会社
アスピレーター SP-30	東京エム・アイ商会
2. インキュベーター	
CO2インキュベーター・MCO-18AIC(UV)	三洋電機株式会社
CO2インキュベーターウォータージャケット160L SCI-325D	株式会社アステック
ミニ高温水槽 NT-2020	日伸理化株式会社
3. マイクロインジェクション	
FemtoJet	eppendorf
Injection Man NI 2	eppendorf
4. 顕微鏡	
TCS-SP8	Leica
Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)	
470 nm パルスレーザー (MODEL: PDL800-B, SERIAL: 01029349)	PicoQuant
TCS-SP8 制御ソフトウェア Las-X	Leica
SymphoTime64	PicoQuant
LeicaDMIL	Leica
5. 対物レンズ	
N PLAN 10×/0.25 PH1 ∞/-/B	Leica
HCX PLAPO 63×/1.40-0.60 OIL λ _{BL}	Leica
IR-LEGO	
1475 nm CWレーザー (Model: FPLD-1475-490-C, Serial: 16FP147549003)	FiberLabs Inc
アクチュエーター (Model: GIP101, SER. No:00273)	シグマ光機
シャッターコントローラー (Model: SSH-C2B, SER. No:1505005011)	OptoSigma
7. ステージヒーター	
(株)東海ヒット顕微鏡培養システム (STG-WSKMX=SET)	東海ヒット
ステージアダプター (MK-IX3)	東海ヒット
8. 熱電対	
DEGITAL THERMOMETER MC1000-000 (1.04)	CHINO
Flexible Thermo probe TI-SP-K-TCNIM	AS ONE
9. 遠心機	
微細高速遠心機 (CFI15RN)	日立工機
アングルローター (TI5A44)	日立工機
10. レーザー	
フォトダイオードセンサ (PD300-TP P/N 7Z02424)	Ophir
レーザーパワーメーターモニター (Vega P/N 7Z01560)	Ophir

3-1. 培地・試薬の調製

3-1-1. 培養培地の調製

クリーンベンチ内で Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (D6429, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 500 ml に熱により不活化した Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France) 25 ml, Horse Serum (HS) (Gibco, Waltham, MA) 25 ml を加え、それぞれ終濃度が 5% (V/V) になるように調製した。次に、ペニシリン-ストレプトマイシン混合液(15140122, Thermo Fisher, Waltham, MA) 1.65 ml を加え、ペニシリン終濃度が 30 units/ml、ストレプトマイシン終濃度が 30 µg/ml になるように調製し、転倒混和後、4°C で保存した。

3-1-2. 分化用培地の調製

クリーンベンチ内で DMEM 培地(Sigam D6429) 500 ml にペニシリン-ストレプトマイシン混合液 1.65 ml を加え、ペニシリン終濃度が 30 units/ml、ストレプトマイシン終濃度が 30 µg/ml になるように調製した。その後転倒混和し、4°C で保存した。

3-1-3. 観察用培地の調製

クリーンベンチ内で DMEM 培地(gibco 21063029) 500 ml に 1 M HEPES-KOH (pH.7.4)を 17.5 ml 加え、HEPES 終濃度が 30~60 mM になるように調製した。その後転倒混和し、4°C で保存した。

3-1-4. 血清の非働化

-20°C で凍結保存されている FBS、または HS 500 ml を 4°C で 2 日間インキュベートし、解凍した。次に、56°C のウォーターバスに浸し、2~3 分間浸透後、30 分間インキュベートし、非働化した。その後室温で静置し、温度が室温まで下がった氷冷後に、25 ml ずつ分注し、-20°C で凍結保存した。

3-1-5. 1 M HEPES-KOH (pH7.4)の調製

HEPES 23.8 g に MilliQ 水を加えて溶解した。次に 5 M KOH 溶液を少量ずつ加え pH を 7.4 に調整後、MilliQ 水を加えて 100 ml にメスアップした。その後 0.22 µm フィルターにより滅菌後、室温で保存した。

3-1-6. Nerve Growth Fator (NGF)の調製

NGF 100 µg に、あらかじめ終濃度 0.1w/v%で BSA を溶かし 0.22 µm フィルターにより滅菌した PBS を 1 ml を加え、終濃度 100 µg/ml になるように調製した。次にピペッティングにより溶解し、4°C で一晩静置後、-80°C で凍結保存した。本研究で使用した NGF の分子量は、26 kDa であり、50 ng/mL のとき約 1.9 nM である。

3-1-7. 0.1 M ホウ酸バッファー(pH8.5)の調製

H₃BO₃ 0.6 g に MilliQ 水を加え溶解し、1M KCl 10 ml を加えた。次に 2 M NaOH 溶液を少量ずつ加え pH を 8.5 に調製後、MilliQ 水を加えて 100 ml にメスアップした。その後 0.22 μm フィルターにより滅菌後、室温で保存した。

3-1-8. Dextarn Texas Red (TR-Dex (D1828、Thermo Fisher))溶液の調製

TR-Dex 25 mg に マイクロインジェクション溶液 500 μl を加え、終濃度 25 mg/ml になるように調製した。ピペッティングにより溶解した後 20 μl ずつ分注し、遮光状態で-20°C 凍結保存した。使用する際には、25 mg/ml TR-Dex ストック溶液 20 μl に マイクロインジェクション溶液 80 μl を加えてピペッティングし、終濃度が 0.5% (W/V)になるように調製した。

3-1-9. マイクロインジェクション溶液の調製

KCl 9.7g、NaCl 1.3 g、K₂HPO₄ 1.4 g に MilliQ 水で溶解し、1 L にメスアップして溶液①(130 mM KCl、22 mM NaCl、10 mM K₂HPO₄)とした。次に、KCl 9.7g、NaCl 1.3 g、KH₂PO₄ 1.7 g に MilliQ 水で溶解し、1 L にメスアップして溶液②(130 mM KCl、22 mM NaCl、10 mM KH₂PO₄)とした。溶液②に溶液①を少量ずつ加え pH7.4 に調整し、0.22 μm フィルターによりろ過後、-20°C で凍結保存した。

3-2. Fluorescence Polymeric Thermometer (FPT)溶液の調製

温度感受性蛍光ポリマーである FPT は、東京大学大学院薬学研究科の岡部らにより合成された⁽²⁸⁾ものを使用した(図 2、図 3、図 4)。水中で FPT 粉末にマイクロインジェクション溶液を加え、終濃度 0.5 % (W/V) になるように調製した。次に水中で振盪し、溶解させた後 4°C で一晩静置した。翌日、0.22 μm フィルターろ過を 4°C、10,000 rpm、7 分間の遠心により行い、全量をタンパク質低吸着チューブに移した後、遮光した状態で 4°C 保存した。

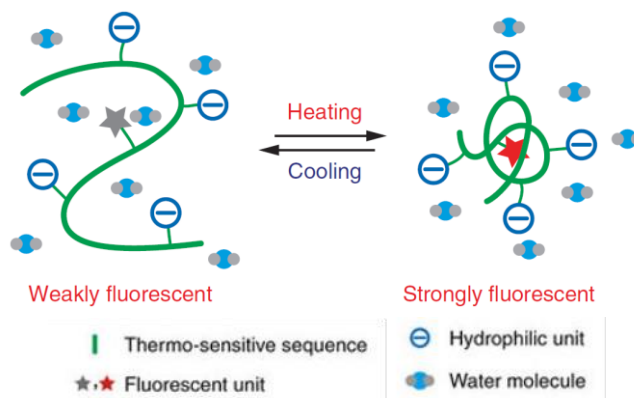


図 2. 温度に応答した FPT のコンフォメーション変化と蛍光応答の模式図⁽²⁸⁾

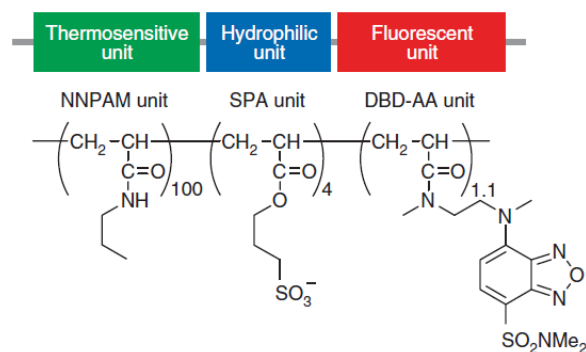


図 3. FPT の化学構造⁽²⁸⁾

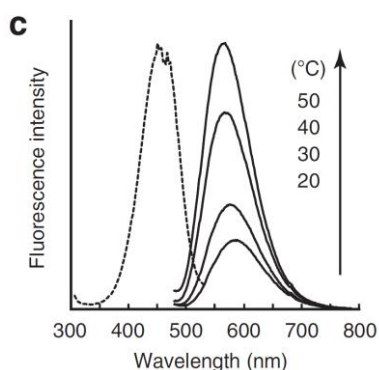


図 4. PBS 溶液中における FPT の励起スペクトル(点線、Ex488)と蛍光スペクトル(実線、Em575)⁽²⁸⁾

3-3. 細胞培養

神経用細胞である PC12 細胞は Riken Bioresource Center (No. RCB0009, Tsukuba, Japan)から購入したものをを使用した。以下にクリーンベンチ内での細胞培養操作を示す。

3-3-1. PC12 細胞の凍結ストック起こし

-80°C で保存していた凍結ストックを手で温め、ある程度溶解した。次に培養用培地 1 ml を加え、ピペッティングにより溶解・懸濁後、全量を培養用培地 9 ml に加えた。この細胞懸濁液を 1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をアスピレータで除去した。培養用培地 1 ml を加えてピペッティングにより懸濁し、全量をあらかじめ 37°C でインキュベートしていた 60 mm ディッシュ中の培養用培地 2 ml に均一に播種した。上記操作によりできた細胞サンプルを継代 0 代目とし、37°C、5% CO₂ で培養をインキュベートした。翌日、培地をアスピレータで除去後、新しい培養用培地 3 ml を入れて培地交換をした。

3-3-2. PC12 細胞の継代

60 mm ディッシュに播種した細胞をセミコンフルエントになるまで培養した。培地をアスピレータで除去し、培養用培地 2 ml を加え、ピペッティングにより懸濁した。この細胞懸濁液 10 μL を血球計算盤とカバーガラスの間に入れ、実体顕微鏡(Leica DM IL)と 10 倍対物レンズを用いて、細胞数を計測した。その後、あらかじめ 37°C でインキュベートしていた培養用培地をそれぞれ 1.5 ml 入れた 35 mm ディッシュ、3 ml 入れた 60 mm ディッシュ、10 ml を入れた 100 mm ディッシュに播種した。この時、35 mm ディッシュ細胞密度は 5×10^4 cells/ml、60 mm ディッシュ細胞密度は 1×10^5 cells/ml、100 mm ディッシュ細胞密度は 1×10^6 cells/ml になるように播種した。上記操作によりできた細胞サンプルを元の細胞サンプルの継代+1 代目とし、37°C、5% CO₂ でインキュベートした。

3-3-3. PC12 細胞の凍結保存

100 mm ディッシュに播種した継代 2 代目細胞サンプルを、セミコンフルエントになるまで培養した。培地をアスピレータで除去し、培養用培地 5 ml を加え、ピペッティングにより懸濁した。この細胞懸濁液を 1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をアスピレータで除去した。Cell Banker 溶液を 2.5 ml 加え、ピペッティングにより懸濁した。その後、500 μl ずつ分注し、一日前から 4°C でインキュベートしておいた BICELL に入れ、-80°C で凍結した。翌日、凍結ストックを細胞凍結用容器 BICELL から取り出し、-80°C で保存した。

3-3-4. 実験で使用した細胞サンプルの調製

3-3-4-1. 細胞内温度計測に使用した細胞サンプルの調製

顕微鏡観察のため、細胞サンプルは、35 mm Poly-L-Lysine (PLL)コートガラスボトムディ

ッシュ(D11131H MATSUNAMI, Kishiwada, Japan)に播種した。また、セミコンフルエントになるまで中1~2日培養し、観察日の1日前に分化用培地に交換した。

3-3-4-2. 神経突起伸長度計測に使用した細胞サンプルの調製

本実験に使用した細胞サンプルは、全て PLL コーティングディッシュに播種した細胞サンプルを使用した。また、コンフルエント率が50%を超える前まで培養し、実験日の1日前に分化用培地に交換した。

3-4. PC12 細胞の分化

アスピレータを用いて分化用培地をガラスボトム部分だけ残して除去し、予め50 ng/ml NGF に調製した分化用培地、または観察用培地を750 μ l 加えた。この操作をもう一度繰り返した後、50 ng/ml NGF 含有分化用培地1.5 ml を加えた。

3-5. マイクロインジェクション法

FPT および細胞トレーサーとして用いた TR-Dex (D1828, Thermo Fisher) の細胞への導入は、マイクロインジェクション法を用いた。細胞を TCSSP8 共焦点顕微鏡で観察しながら、固定されたディッシュに対して、ガラス毛細管針 (Femtotips II, Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて細胞質にマイクロインジェクションした。注入溶液の体積はおよそ2 fL と見積もられた。

3-6. 共焦点蛍光顕微鏡(TCS-SP8)による細胞観察

3-6-1. 蛍光寿命測定顕微鏡(FSIM)について

蛍光寿命イメージング顕微鏡(FSIM)を用いることで、励起状態の分子由来の光子が基底状態に戻るまでの時間を測定することができた(図 5)。細胞標識などに用いる有機小分子蛍光色素の蛍光寿命は多くの場合ナノ秒オーダーであり、この蛍光寿命は蛍光色素が置かれている環境に応答して蛍光寿命を変化させる。また、原理的には蛍光寿命の絶対値は光子数に依存しないため、測定フォーマットを向上させることで、ごく微小な環境の蛍光寿命も測定可能である。つまり、この蛍光寿命により細胞内局所の温度などの蛍光色素を取り巻く微小な環境に関する情報を獲得することができる。

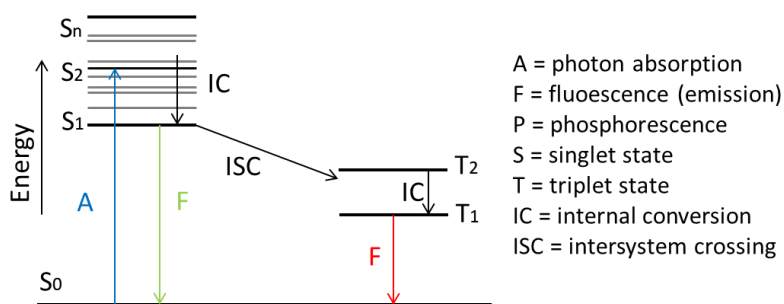


図 5. ヤブロンスキー図

3-6-2. 共焦点蛍光顕微鏡(TCS-SP8)による蛍光寿命イメージングについて

以下に TCS-SP8 共焦点顕微鏡の概略図を示す(図 6)。TCS-SP8 共焦点顕微鏡に Time-Correlated Single-Photon Counting(TCS-PC)モジュールを連結した。Fluorescence lifetime imaging microscopy(FSIM)を利用し、FPT の蛍光寿命を測定した。470 nm パルスレーザーにより励起された光子が検出器に届くまでの時間をスタート・ストップタイムとし、複数のスタート・ストップタイムを組み合わせることで、FPT の減衰曲線を形成することができた(図 7)。得られた減衰曲線は 2 成分フィッティングを行い、平均蛍光寿命を算出した(図 8)。

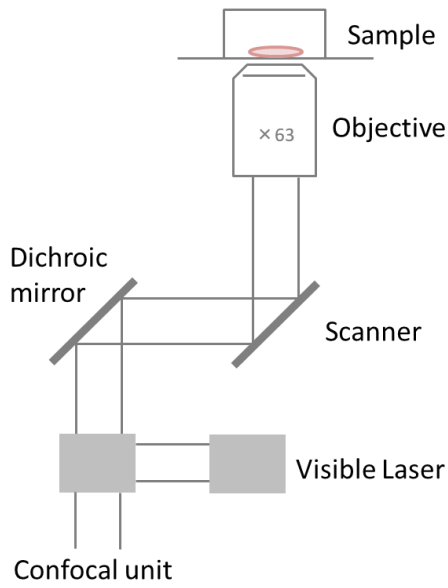


図 6. TCS-SP8 の概略図

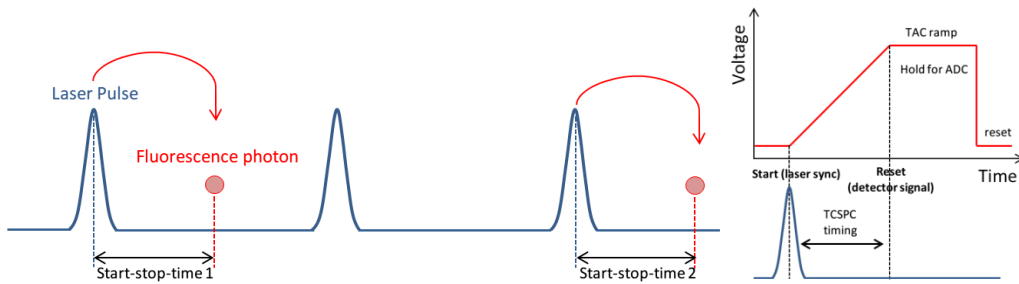


図 7. TCSPC による蛍光寿命測定 の原理

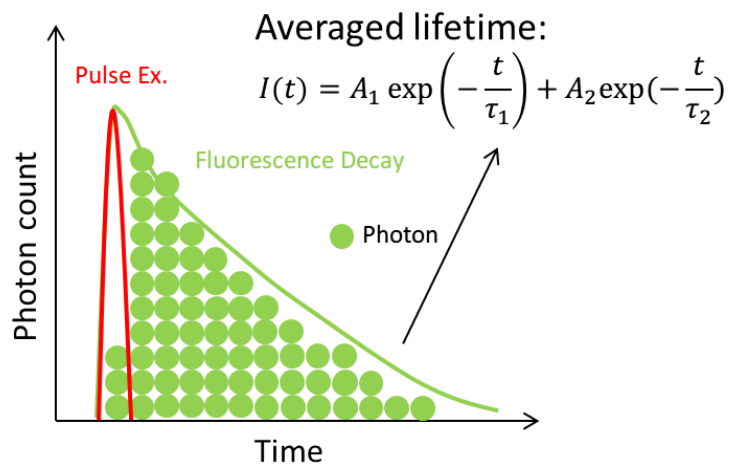


図 8. TCS-PC により測定した FPT の減衰曲線の模式図

3-6-3. TCS-SP8 共焦点顕微鏡を用いた細胞観察

細胞観察において 63 倍、または、40 倍の油浸対物レンズと 20 倍の対物レンズを使用した。また、細胞の画像は Format 1024×1024 pixel で取得した。蛍光視野像を取得する際には、FPT の場合 488 nm CW(continuous wave: 連続波) レーザーで励起し、検出蛍光波長は 500-700 nm に設定した。デキストランテキサスレッドの場合 552 nm CW レーザーを用いて励起し、検出蛍光波長は 561-650nm に設定した。

3-6-4. FLIM(TCS-PC)を用いた細胞内 FPT の蛍光寿命測定

細胞サンプルの培地をアスピレータで除去し、NGF 無刺激サンプルの場合は観察用培地 1.5 ml、NGF 刺激サンプルの場合はあらかじめ 50 ng/ml NGF になるように調製した観察用培地 1.5 ml を加えて培地交換をした。次に、細胞サンプルに 3.5 記載の手順に則り、FPT を導入し、細胞内での温度測定は FPT が示す蛍光寿命を測定することにより行った。熱電対を用いて培地温度を測定・モニターし、ステージインキュベータを用いて培地温度を室温から 30°C まで上げた。この時、FPT の過度の凝集を防ぐために、ヒーター温度の設定値を徐々に上げることで 7 分間に 1 °C ずつ温度を上昇させた。その後、温度上昇に伴いサイズが縮小した FPT を核内まで拡散させるために、30 分静置後、蛍光観察を開始した。観察は培地温度が 30 ±0.1 °C または、37 ±0.1 °C の範囲で行い、温度が変化した場合にはステージインキュベータのヒーター温度の設定値を変えることによって 30 °C にした。蛍光寿命は FLIM により計測した。励起光には 470 nm のパルスレーザーを使用し、強度は 44-45%、出力は 20MHz に設定した。検出蛍光波長は 500-700 nm に設定し、その他 FLIM 条件を format 128×128 pixel, speed 100 Hz, Zoom Factor 5, Pinhole 1 に設定した。また、Duration Time を 30 秒に設定し、単一細胞からのフォトンを積算した。蛍光寿命画像は 10-20 回蓄積して取得した。

測定条件

励起蛍光波長: 470 nm
検出蛍光波長: 500-700 nm
Pulse frequency : 20 MHz
Scanning frequency : 100 Hz
Duration : 30 sec
Medium temperature : 30 ± 0.1 °C

3-6-5. SymphoTime64 による蛍光寿命解析

平均蛍光寿命に関する理論式にパラメーターを代入することにより、蛍光寿命を決定した⁽²⁹⁾。TCSPCにより測定したFPTの減衰曲線は、解析ソフトウェアSymphoTime64を用いて2成分の指数関数によりフィッティングし、光子数と時定数を算出し、理論式(2)を適用することで平均蛍光寿命を算出した。以下に解析方法を示す(図9)。SymphoTime64により解析した蛍光寿命データは、減衰曲線のピークとなる光子数が細胞あたり1,000 counts以上に達したものを選択した。式(1)に示す2成分の指数関数のフィッティングにより、蛍光減衰曲線に含まれる各成分を蛍光寿命 τ とその強度 A が得られ、

$$I(t) = A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (1)$$

次にこれらの値を用いて、平均蛍光寿命(τ_f)を以下の式(2)によって算出した。

$$\tau_f = (A_1\tau_1^2 + A_2\tau_2^2)/(A_1\tau_1 + A_2\tau_2) \quad (2)$$

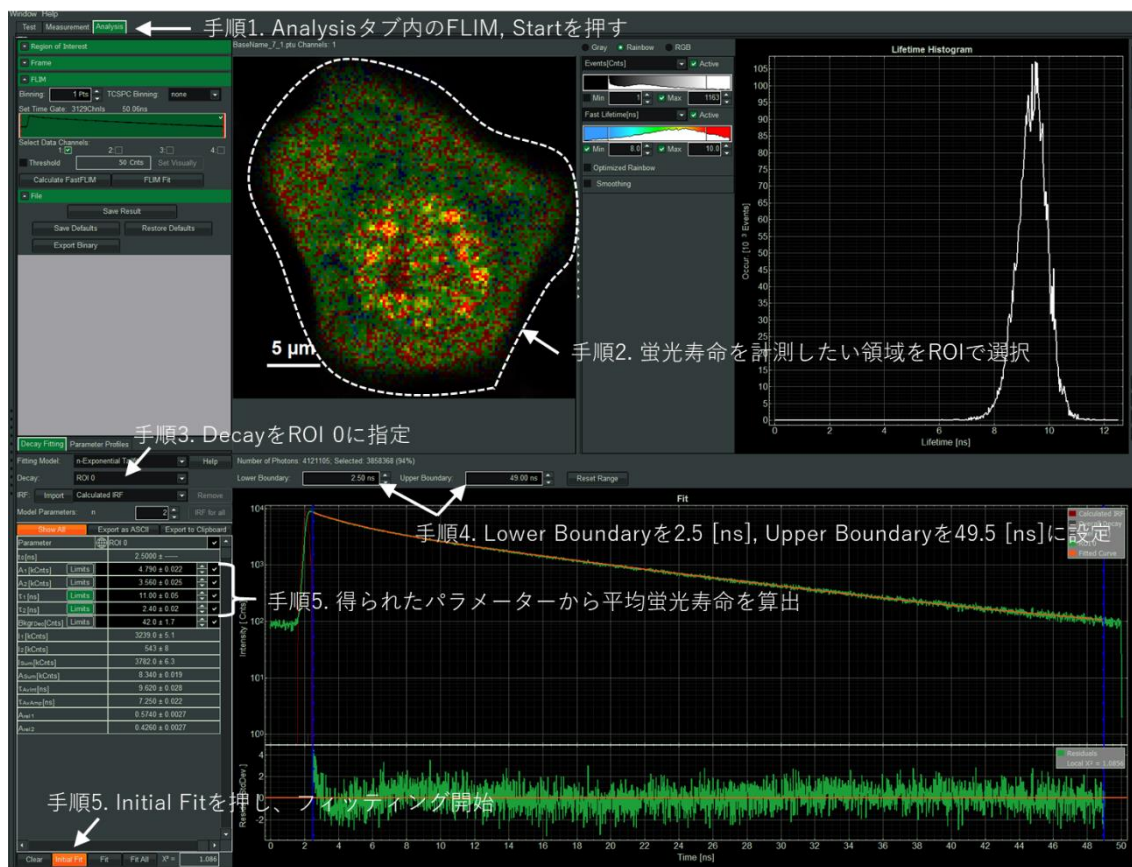


図9. SymphoTime64 を用いた蛍光寿命解析手順

3-6-6. 神経突起伸長の計測

分化を誘導させた細胞が伸長させた神経突起の計測には TCSSP8 制御ソフトウェア Las X で取得した画像イメージを Annotations, Draw scalebar 機能を使用して測定した(図 10)。

また、突起伸長の測定については、図 11 のように一つの細胞に対して最も長い神経突起をその細胞の神経突起として統計処理した。また、細胞体のサイズ以上のものを神経突起として測定を行った。従って、細胞の大きさ未満の長さの突起は神経突起として認めず、細胞体未満の大きさの突起しか持たない細胞の神経突起の長さは 0 として統計処理した。

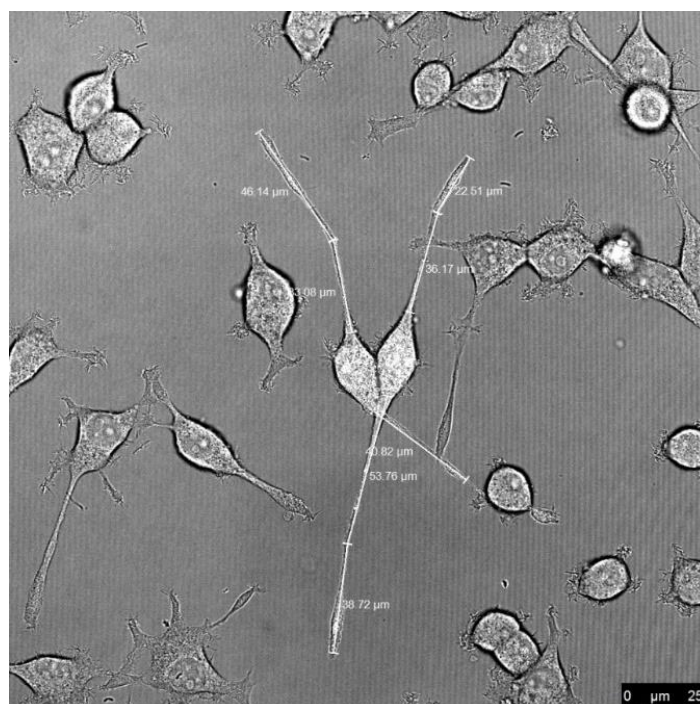


図 10. LasX を用いた PC12 細胞の神経突起伸長の計測
* デキストランテキサスレッドで細胞を標識

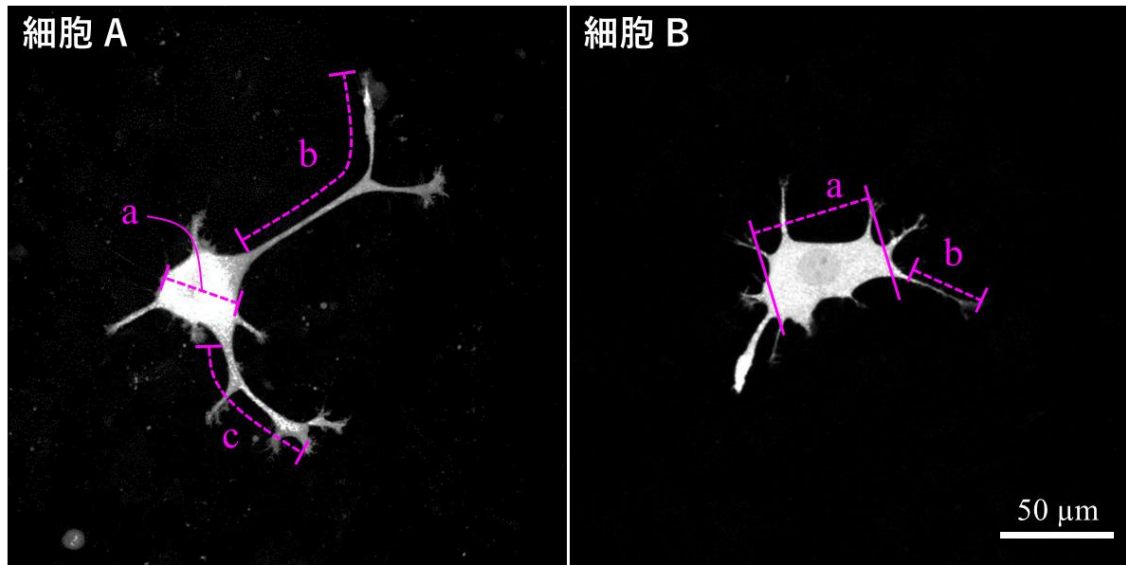


図 11. 突起を伸長させた PC12 細胞

* 神経細胞のトレーサーとして使用される dexran (TR-Dex) を注入している。

細胞 A では細胞体の大きさは a であり、突起長 b, c は、それぞれ $a < b, a < c$ であるため、突起 b, c はともに神経突起である（分化した細胞）と定義される。それぞれの神経突起の長さが $b > c$ であることから、細胞 A の神経突起の長さは b となる。一方、細胞 B では細胞体の大きさ a が突起 b の長さと比較して $a > b$ であり、細胞体よりも長い突起が見られなかったことから、細胞 B の神経突起の長さは 0（未分化細胞）として統計処理した。この定義については、T. Kudo, *et al.*: Induction of neurite outgrowth in PC12 cells treated with temperature-controlled repeated thermal stimulation: *PLOS ONE*: **10**, e0124024, 2015 を参考にした。

3-7. 赤外(IR)レーザーによる局所加熱

3-7-1. IR-LEGO (Infrared Laser-Evoked Gene Operator)について

IR-LEGO は赤外(IR)レーザーを用いて単一細胞を局所加熱し、ヒートショックプロモーターの下流の遺伝子発現を誘導する技術である⁽³⁰⁾。この IR レーザーは細胞内部の任意の直径約 2~5 μm 程度の領域に集光でき、局所的な加熱を可能とする。さらに、近赤外光を用いることで光毒性の無い刺激が可能であることや、金属粒子などの発熱素材を導入する必要もないことから、本研究では細胞内に局所的な熱刺激を与えるために使用した。以下、IR-LEGO の概略図を示す(図 12)。TCSSP8 共焦点顕微鏡に IR-LEGO を連結した。1475 nm IR レーザーは対物レンズを通してサンプルのガラス表面に達し、直径約 2~5 μm の領域にて温度が上昇した。

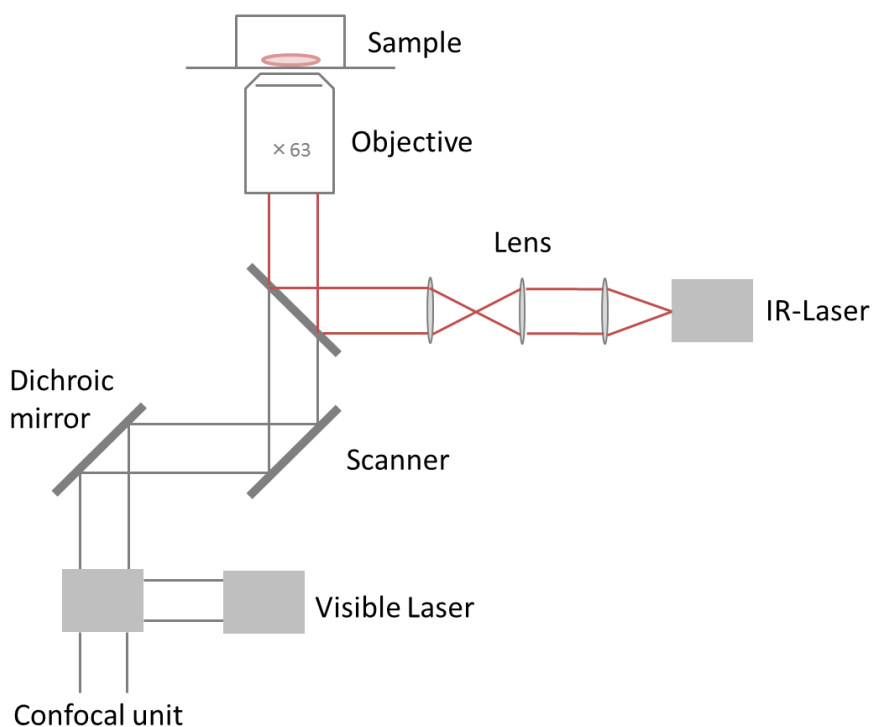


図 12. IR-LEGO の概略図

3-7-2. IR レーザーの照射点合わせ

カバーガラスに黒色インクを塗り、インクを塗った面を上にして TCSSP8 ステージホルダーに設置した後、インクを塗った面に焦点を合わせた。Las X の Zoom Factor を 0.75 でモニターしながら IR レーザーの強度を 200 mW に設定し、出力した。この時、カバーガラス上のインクが飛散した部分を照射点とし、PC のスクリーン上の照射点部分にシールを貼った。実際に細胞サンプルに IR レーザーを照射する際には、Las X の Zoom Factor を 0.75 でモニターしながらステージを動かす、スクリーン上のシール部分に照射したい位置を合わせた。IR レーザー使用時は、倍率 63 倍の油浸対物レンズでのみ観察を行った。

3-7-3. IR レーザーの照射

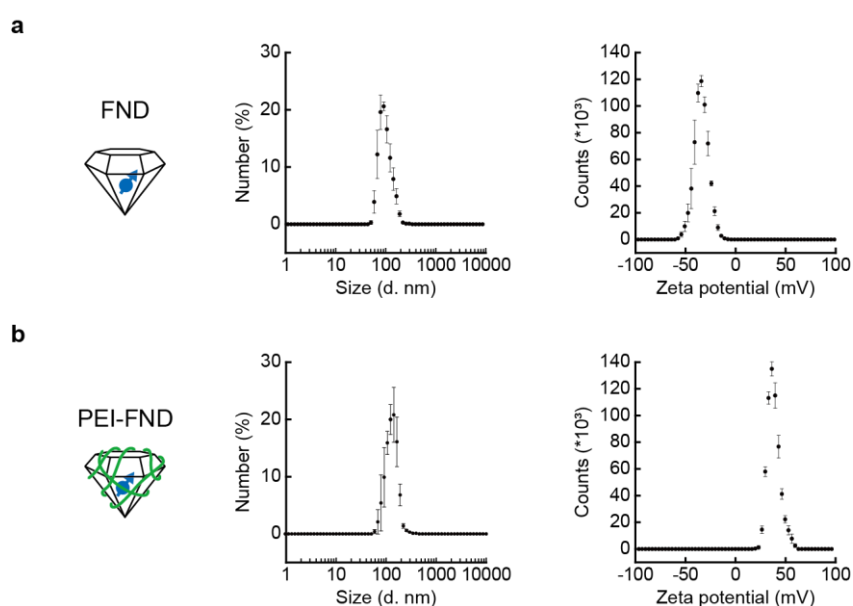
3.5 の手順に則り、細胞に対しデキストランテキサスレッドをマイクロインジェクション法により導入した。その後、培地温度を熱電対で測定、モニターし、ステージインキュベーターを用いて培地温度を室温から 37°C に上げた。TCS-SP8 共焦点顕微鏡を用いて蛍光色素を導入した細胞を見つけ、細胞位置の座標を記録後、Las X で細胞の画像を取得した。画像取得後、目的の細胞の照射点に向けて IR レーザーを 12 mW , 15 mW, 21 mW のレーザー強度で照射した。この時、培地温度が 37 ± 0.1°C の範囲で行い、温度が変化した場合にはステージインキュベーターのヒーター温度の設定値を変えることによって 37 °C にした。また、IR レーザー照射により特定の細胞を加熱し続けるため、数分毎に Las X で細胞をモニターし、IR レーザーの照射点が目的の照射点とずれてないか確認し、ずれていた場合はステージを動かして照射点を合わせた。1 時間後、IR レーザーを切って画像を取得し、細胞サンプルを 37°C、5 % CO₂ でインキュベートした。

3-8. Fluorescent nanodiamond (FND) の表面修飾と細胞内温度測定

FND の細胞内への進入効率を高めるために、細胞膜の負電荷に着目し、PEI で修飾することにより、表面が正電荷を帯びた FND を調製した。0.1%w/v の PEI 溶液を未修飾の FND に加え、混合物をボルテックスし、超音波処理し、1 時間攪拌した後、遠心分離 (13,000rpm、3 分間) で FND を回収し、ミリ Q 水で 2 回洗浄した。FND のサイズと表面電荷を Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Malvern, UK) を用いて測定した (補足図 S1)。得られた PEI-FND と未修飾 FND を無血清培地中でそれぞれ最終濃度 5 µg/ml と 10 µg/ml になるように混合し、37°C、5% CO₂ で PC12 細胞とそれぞれ 3 時間と 4 時間インキュベートして細胞内に取り込ませた。未修飾 FND については、細胞内に取り込まれず細胞外膜表面に付着しているのを蛍光顕微鏡で確認した。

FND を用いた細胞内の温度測定は、既報に従い ODMR 顕微鏡を用いて行った⁴⁶。倒立顕微鏡システム (Ti-E, Nikon, Tokyo, Japan) 上で、Nd: YAG レーザー (532 nm) を FND に照射して、NVC (Nitrogen vacancy center) のスピン状態を初期化し、読み出した。ODMR スペ

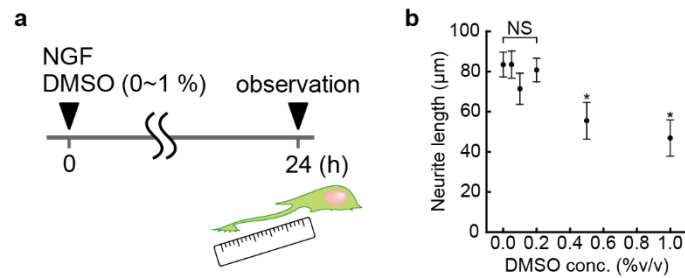
クトルは、マイクロ波照射の有無による蛍光強度の差として、マイクロ波周波数の範囲で記録した。ステージの温度は、ステージトップインキュベーター (TPi-108RH26, TOKAIHIT) を用いて、電動移動ステージ上で 33°C に設定した(培地温度が 30 °C になるように設定)。マイクロ波周波数を 2850~2890 MHz の共振周波数範囲で 0.4 MHz 刻みでデジタル掃引しながら、蛍光画像を記録した。このプロセスを通して、PC12 細胞中の単一 FND 粒子から ODMR スペクトルが得られた。カメラの露光時間は 5ms であった。各マイクロ波周波数に対する 2 つの画像の蛍光強度の蓄積を 32 回繰り返した。次に、それぞれの ODMR スペクトルを 2 つのローレンツ関数の和にフィッティングして、ゼロファイル分割 D を決定した。D は、 $ms = 0$ から 1 と $ms = 0$ から -1 の 2 つの共鳴の中心値と定義した。



補足図 S1. 未修飾および PEI 修飾 FND の性質 (a) 未修飾 FND の直径と zeta potential のヒストグラム。(b) PEI 修飾 FND の直径と zeta potential のヒストグラム。(a, b) データは means \pm s.d. で示した (3 回測定)。

3-9. 細胞内反応の阻害

神経分化過程における細胞内温度への細胞内反応の関与を調べるため、0.8 μ M アクチノマイシン D (595-00261、富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)、1.0 μ M シクロヘキシミド (C7698、Sigma-Aldrich)、および 0.5 μ M サイトカラシン D (037-17561、富士フイルム和光純薬) をそれぞれ神経細胞分化過程における転写、翻訳、およびアクチン重合の阻害剤として用いた。これらの化合物は、それぞれの濃度で培地と混合したジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地交換によって細胞に添加した。培地中の最終的な DMSO 濃度は 0.05%~0.1% で、PC12 細胞の神経突起伸長には影響を及ぼさなかった (補足図 S2)。



補足図 S2. PC12 細胞の神経突起伸長に対する DMSO の影響 (a) 実験の流れ。(b) DMSO 濃度における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さ。データは means \pm s.e. ($n = 30$ cells) で示した。0%v/v DMSO 条件で得られた値と比較した場合、* $P < 0.05$ (unpaired Student's t -test.)。NS は有意ではないことを示す。

3-10. マウス初代大脳皮質ニューロンの調製

ニューロンは、14~15 日齢の胎仔マウスから、既述の方法⁴⁷に若干の修正を加えて調製した。すべての手順は、日本の動物医療ガイドラインに従って行われ、産総研の倫理委員会の承認を得た（許可番号 2023-0008）。脳組織はトリプシン（0.25%、ナカライテスク）で処理し、皮質組織は穏やかに解離した。得られたニューロンを PEI（0.1%、シグマ）コートしたディッシュに $2 \sim 5 \times 10^4$ 個/dish の密度で播種した。神経細胞は L-Alanyl-glutamine（0.5 mM、ナカライテスク）、ウシ胎児血清（2%）、NeuroBrew（2%、Miltenyi Biotec）、Hepes（10 mM、pH7.4）およびグルコース（4.5%）を添加した MEM 培地（ニッスイ）で培養した。

神経細胞の神経突起伸長に対する温度効果を調べるため、ポリマー（FPT_{High} および対照コポリマー）を等浸透圧グルコース溶液（5%）とともに神経細胞に 4°C で 5 分間導入した。突起を含む細胞の形状を導入したポリマーの蛍光で可視化し、神経突起の長さを Fiji ソフトウェアを用いて測定した。

3-11. MAP2 の免疫蛍光染色イメージング

PC12 細胞を PBS 中 4%パラホルムアルデヒド（4%スクロース）で室温 5 分間固定し、PBS 中 50mM NH₄Cl で 5 分間処理し、PBS 中 0.1% Triton X-100（Wako）で室温 5 分間透過処理し、PBS で洗浄後 Blocking One（ナカライテスク）でブロックした。その後、細胞をマウスモノクローナル抗 MAP2 抗体（M4403、Sigma-Aldrich）とインキュベートした。一次抗体は、Alexa Fluor 647（Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA）で標識した二次抗マウス IgG(H+L)抗体で検出した。PBS で 3 回洗浄した後、TCS SP8 共焦点レーザー顕微鏡（Leica Microsystems）を用いて細胞を画像化した。

3-12. 統計解析

統計学的有意性は、Excel ソフトウェア（Microsoft, Redmond, WA）を用いて、対応のない Student の t 検定により決定した。

4. 結果

4-1. PC12 細胞の NGF による分化誘導に伴う神経突起伸長と分化マーカーの発現

PC12 細胞は NGF 処理により、神経突起が伸長した神経細胞様細胞に分化した (図 13a)。本研究では、細胞体の長さよりも長い神経突起を持つ細胞を分化細胞と定義した (図 11)。神経突起の長さは、未分化細胞では $0\ \mu\text{m}$ であったのに対し、分化細胞では最長突起の長さとして測定した。神経突起の伸長は、NGF 処理の約 6 時間後に起こった。平均神経突起長は 24 時間後に約 $71\ \mu\text{m}$ に達した (図 13b)。この分化現象 (神経突起の伸長) は、観察された細胞の 81% で起こった。突出長および分化率の測定による神経突起伸長効率の定量的評価を行うにあたり、第一の評価指標として突出長に着目した。分化表現型の獲得を確認するため、NGF 添加前後で神経分化マーカー (microtubule-associated protein 2: MAP2) の発現を調べた。細胞固定後の免疫染色により、NGF 処理細胞における MAP2 の発現が確認された (図 13c)。

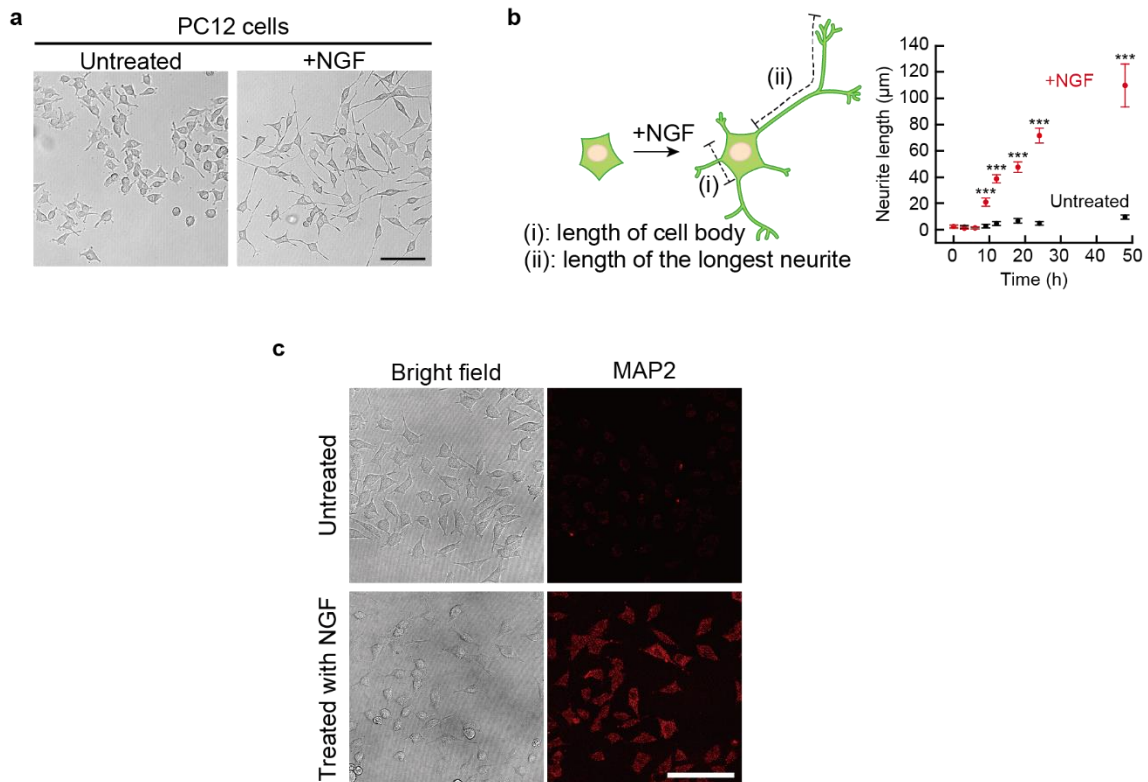


図 13. PC12 細胞を用いた NGF による神経細胞分化の誘導 (a) NGF による神経細胞分化誘導。神経細胞と同様に分化誘導は PC12 細胞において神経突起伸長を引き起こした。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を表す。(b) NGF による神経細胞分化誘導中の神経突起の長さの経時変化。神経突起は、細胞体 (i) よりも長い突起 (ii) と定義した。神経突起成長の時間経過解析 (右)。データは means \pm standard errors (s.e.) ($n \geq 80$ cells) で示した。(c) NGF による神経分化誘導に伴う MAP2 の発現。NGF を 24 時間処理した PC12 細胞と処理しなかった PC12 細胞の明視野像と免疫蛍光像。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を表す。

4-2. 本研究で用いた細胞内温度計測と局所加熱について

次に、細胞内温度測定と局所加熱を用いて、神経分化における細胞内温度の関与を調べた (図 14a)。局所的 ($\phi < 5 \mu\text{m}$) 細胞内の加熱には、赤外レーザー (1475 nm) 照射を用いた⁴⁸。生理的な温度変化を測定するために、高感度の蛍光性高分子温度計 (FPT) 34, 37 (図 14b) と、高いロバスト性を持つ蛍光性ナノダイヤモンド (fluorescent nanodiamonds: FND)^{49,50} (図 14c) を採用した。従来の FPT34 (以下、FPT_{Low}) に加え、より高い温度範囲に応答する FPT_{High} を新たに合成した (補足図 S3a-c)。本研究で用いた FPT および FND は、それぞれ蛍光寿命 (図 14d、補足図 S3d, e) および光学検出磁気共鳴 (optically detected magnetic resonance: ODMR、図 14e、補足図 S3f, g) に温度依存性の変化を示した。

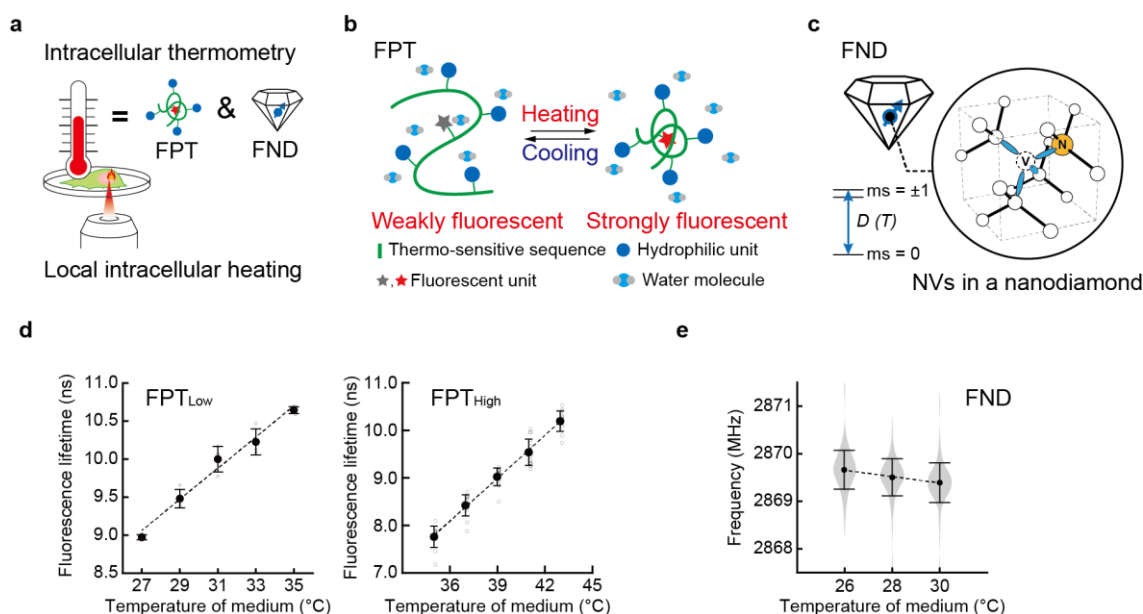
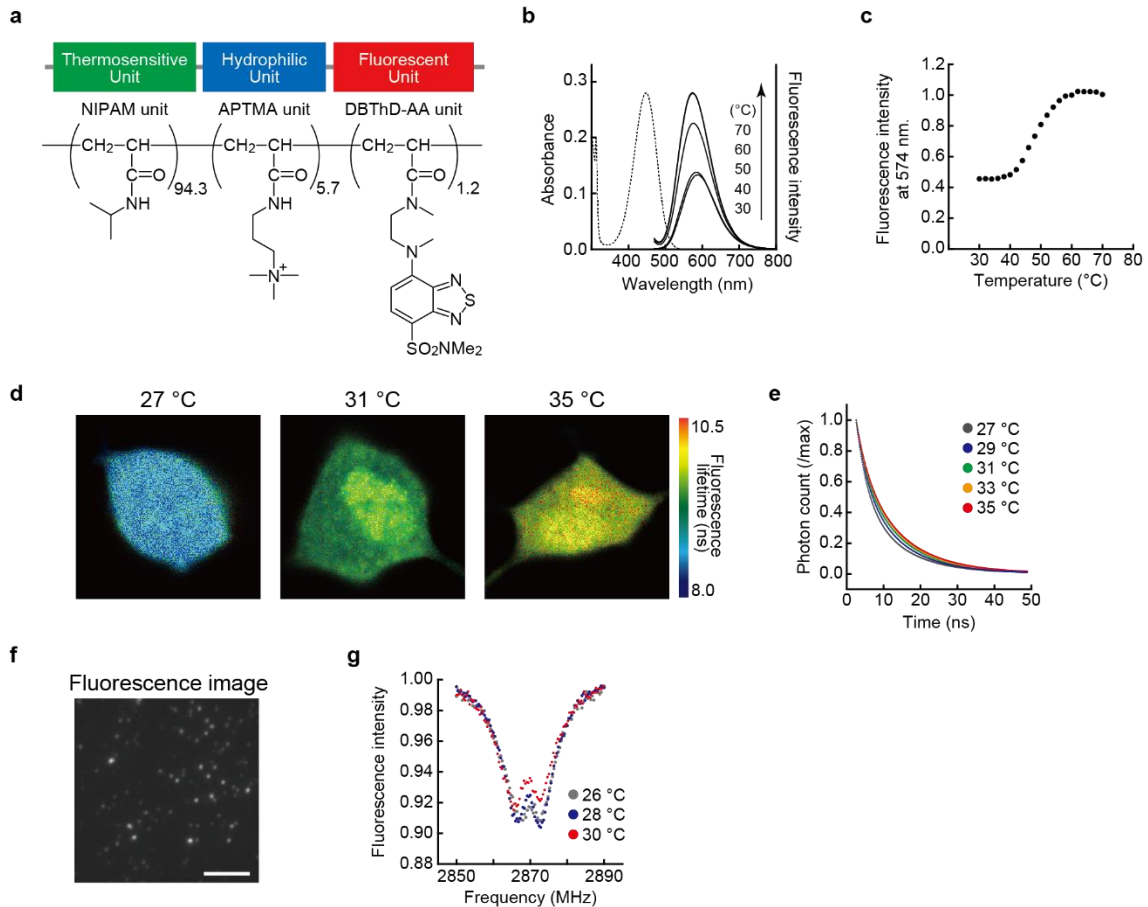


図 14. 本研究の加熱方法と細胞内温度測定法及び温度計の校正 (a) 赤外レーザーを用いた局所的な細胞内加熱と、FPT および FND を用いた細胞内温度測定。(b) FPT による温度測定の原理。(c) FND による温度測定の原理。ダイヤモンド結晶中の NVC (拡大) の構造を示す。白丸、N、V はそれぞれ炭素原子、窒素原子、空孔を表す。NVC はその軌道基底状態において、 $ms=0, \pm 1$ の 2 つの電子スピン状態を持ち、これらは温度依存のゼロ磁場分裂 $D(T)$ によってエネルギー的に分離されている。(d) FPT の蛍光寿命の温度依存変化。データは means \pm standard deviations (s.d.) ($n = 4$ cells for FPT_{Low} and $n \geq 12$ cells for FPT_{High}) で示す。点線は線形フィッティングを表す ($R^2 = 0.99$ for FPT_{Low} and 0.99 for FPT_{High})。 (e) 培地中の FND の共鳴周波数 $D(T)$ の温度依存的变化。データは means \pm s.d. ($n \geq 77$ particles) で表す。点線は線形フィッティング ($R^2 = 0.99$) を示す。



補足図 S3. 細胞内温度センサーの特性と温度依存性 (a) 高温相転移を持つ蛍光性高分子温度計 (FPT_{High}) の化学構造。感温性ユニット：poly-*N*-isopropylacrylamide (NiPAM)；親水性ユニット：3-(acrylamidopropyl) trimethylammonium (APTMA)；蛍光性ユニット：*N*-{2-[(7-*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxathiadiazol-4-yl](methyl)amino}ethyl-*N*-methylacrylamide (DBThD-AA)。数字はコポリマー中の各ユニットの割合を示す。(b) メタノール中の吸収スペクトル（破線、20°C）と KCl 溶液中の蛍光スペクトル（実線）。蛍光スペクトルは 450 nm で励起して得られた。(c) KCl 溶液中の温度変化に対する蛍光強度応答。(d) FPT_{Low} の温度依存蛍光寿命。PC12 細胞における蛍光寿命マッピング。スケールバーは 10 μm を表す。(e) 各温度で培養した PC12 細胞の蛍光減衰曲線。(f) カバースリップ上のポリエチレンイミン(PEI)-FND の代表的な蛍光画像。スケールバーは 10 μm を表す。(g) 各温度における FND の代表的な ODMR スペクトル。

FPT の応答から細胞内温度を較正するために、PC12 細胞内の FPT の平均蛍光寿命と培地温度との関係を線形近似した (図 14d)：

$$\tau f(T) = 0.2046T + 3.505 \quad (1), \text{ FPT}_{\text{Low}} \text{ の場合}$$

$$\tau f(T) = 0.3005T + 2.724 \quad (2), \text{ FPT}_{\text{High}} \text{ の場合}$$

ここで、 T と $\tau f(T)$ はそれぞれ $T^{\circ}\text{C}$ における温度 ($^{\circ}\text{C}$) と蛍光寿命 (ns) を表す。FPT の検量線を多項式で近似する方法が確立されているが³⁴、本研究では狭い温度範囲での比例応答から検量線を作成したため、FPT 応答は直線近似された。

測定された ODMR ピークの熱シフト $\Delta D/\Delta T = -0.068 \text{ MHz}/^\circ\text{C}$ (図 14e) に基づいて温度変化を求め、PC12 細胞の分化前後の FND の温度変化を推定した。

4-3. 細胞内温度計測を用いた IR レーザーによる局所的な細胞内加熱の定量化

IR レーザーによる局所的な細胞内加熱時に FPT_{High} を用いて細胞内温度マッピングを行った結果、様々な照射強度に対する PC12 細胞の温度変化と空間分布 (すなわち温度勾配) を定量化することができた (図 15a)。その結果、赤外レーザーを照射した細胞では、 $<5 \mu\text{m}$ の領域限定的な温度勾配が形成された (図 15b)。様々な強度の IR レーザー照射に対する温度変化の程度と温度勾配を核と細胞質で調べた。これらの領域では、人工的な温度勾配を局所的に発生させることができた (図 15c)。加熱により温度が上昇した部分の平均温度変化を推定したところ、核と細胞質において強度依存的に IR レーザーによる加熱が可能であることが確認された (図 15d)。定量化された温度変化 (ΔT) の標準誤差は約 10%であった (例えば、 $150 \mu\text{W}$ 加熱では $\Delta T = 3^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$)。温度変化 (ΔT) のばらつきは、細胞間、あるいは細胞内の局所領域 (すなわち、温まりやすい細胞や領域とそうでない領域) 間の熱力学的環境の潜在的な違いに起因している可能性があるという仮説を立てた。この研究では加熱領域が小さい ($5 \mu\text{m}$) ため、このような局所的な環境の影響は平均化されにくい。

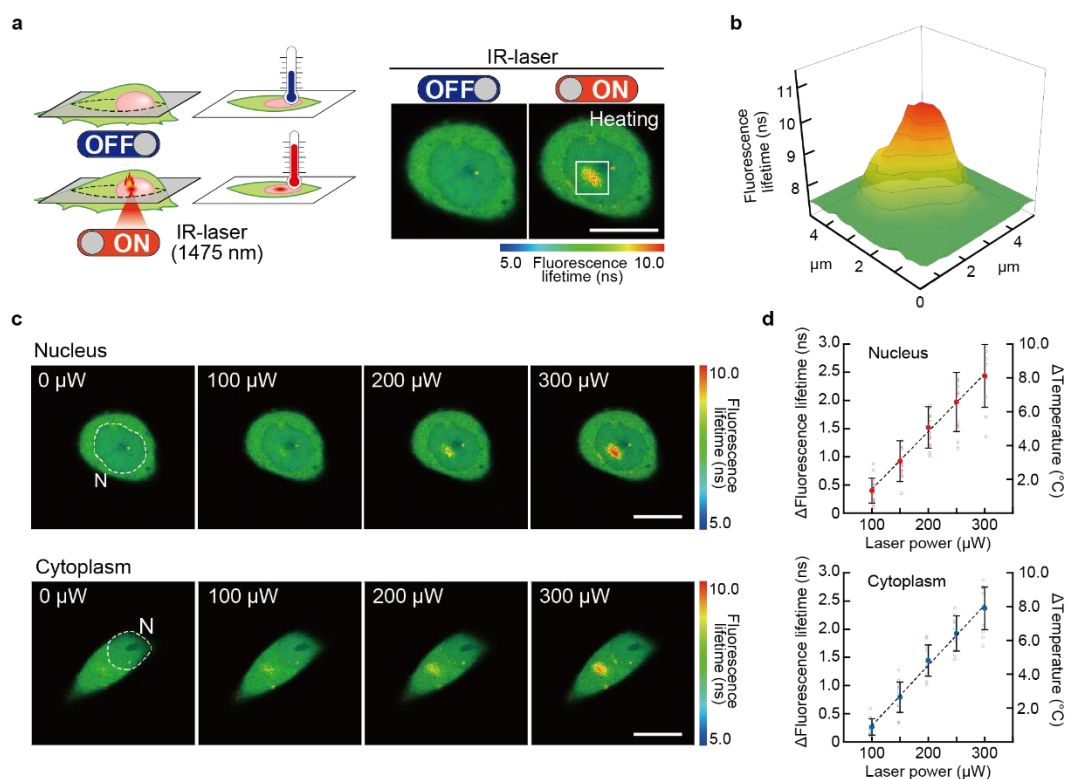


図 15. IR レーザー照射による PC12 細胞の定量的局所加熱 (a) 赤外線レーザー照射 ($250 \mu\text{W}$) による細胞内加熱 (核内) の模式図と代表的な共焦点蛍光寿命画像。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。(b) (a) の赤外レ

レーザー照射による加熱で生じた温度勾配。(c) 様々な強度の IR レーザー照射による核または細胞質内の温度分布の変化。スケールバーは 10 μm を表す。N は核を示す。(d) IR レーザー強度の関数としての照射領域の蛍光寿命と対応する温度上昇の検量線。データは $\text{means} \pm \text{s.d.}$ ($n \geq 8$ cells) で示す。点線は線形フィッティングを示す (核と細胞質について $R^2 = 0.99$)。

IR 照射による細胞内局所加熱

TCS SP8 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems) に IR レーザー (1,475 nm, Sigma-Koki, Tokyo, Japan) を装着し、細胞内局所加熱を行った。IR レーザーは、メカニカルシャッター (SSH-C2B、シグマ光機) で制御された HC PL APO 63 \times 1.4 oil CS2 対物レンズ (Leica Microsystems) を通して照射された。加熱中の培地温度は、ステージトッピンキュベーター (STG-WSKMX-SET、TOKAI HIT) を用いて $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ に設定した。レーザー強度依存的な FPT_{High} 応答から細胞内温度上昇 (ΔT) を校正するため、FPT 蛍光寿命とレーザー出力の直線近似に基づき、PC12 細胞の IR レーザー照射領域における FPT 蛍光寿命の変化から温度変化を算出した。

$\tau f = 0.01025P - 0.5995$ (3)、核における加熱の場合

$\tau f = 0.01069P - 0.7793$ (4)、細胞質での加熱の場合

ここで、 τf と P はそれぞれ蛍光寿命 (ns) と赤外レーザーパワー (μW) を表す。

4-4. NGF による神経分化過程における細胞内局所加熱による神経突起伸長の促進

先行研究では、細胞全体の加熱を行っていたのに対して、本研究では、細胞内の局所的な温度上昇が神経分化に及ぼす影響を評価するため、NGF 処理した PC12 細胞の神経分化中に、IR レーザーを用いて一定時間、単一細胞の局所的かつ定量的な加温を行った。神経突起の長さや形成率 (細胞体よりも長い神経突起を形成した細胞の割合として定義) を NGF 処理 24 時間後に測定した (図 16a)。加熱中の異なる実験条件 (例えば、顕微鏡でのインキュベーション時間) が神経突起伸長に及ぼす影響を考慮するため、刺激なしの対照実験を各実験条件について行った。加熱のタイミングは、NGF 添加直後 (30 分以内、条件[i]) と 6 時間後 (突起伸長開始直前、条件[ii]) を選んだ (図 13b)。突起観察および細胞追跡のため、NGF 添加直後に蛍光色素である Texas Red-labeled dextran (TR-Dex) をマイクロインジェクションして標的細胞を可視化した。非加熱細胞と比較して、NGF 添加直後に核を 1 時間加熱した細胞 (条件[i]) は、NGF 処理 24 時間後に神経突起が長くなった (図 16b)。神経突起伸長に対する加熱強度の影響を調べるため、異なる温度差 ($\Delta T = +2^\circ\text{C}$, 3°C , 5°C) と一定の加熱時間 (1 時間) で神経突起伸長を測定した。神経突起は適用した温度増分に応じて長くなった (図 16c、補足図 S4a)。一部の細胞は、高レーザー強度 ($\Delta T = +5^\circ\text{C}$) での加熱中または加熱後に、ディッシュから剥離する細胞が多く見られた (補足図 S5)。このような熱による細胞毒性を避けるため、より生理学的に穏やかな加熱強度 ($\Delta T = +3^\circ\text{C}$) が最適で

あると選択された。

次に、異なる加熱時間（10分、20分、30分、60分）と加熱強度の最適条件（ $\Delta T = +3^\circ\text{C}$ ）を用いて、神経突起伸長に対する加熱時間の影響を調べた。10分間の加熱は神経突起伸長には影響が観察されなかったが、20分以上の加熱は神経突起伸長を有意に促進した。30分間の加熱は、神経突起伸長に最も強い影響を与えた（図16d、補足図S4b）。NGF処理6時間後（条件[ii]）に同じ加熱条件（ $\Delta T = +3^\circ\text{C}$, 30分）を適用すると、神経突起伸長の中程度の促進が見られたが、これはNGF添加直後に加熱した場合に観察されたものよりも弱かった（図16e、補足図S4c）。これらの結果は、NGF添加直後に核内の温度を一定時間上昇させると、神経突起伸長が促進されることを示している。

同様に、細胞質加温が神経細胞の分化に及ぼす影響を調べたところ、神経突起伸長促進に対する影響は核加温よりも弱いことが示された（図16f, g、補足図S4d-f）。

さらに、核の局所領域を同じ条件（ $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ 、30分）で加熱したNGF処理細胞では、加熱しなかった細胞に比べ、MAP2の発現が増加した（補足図S6）。

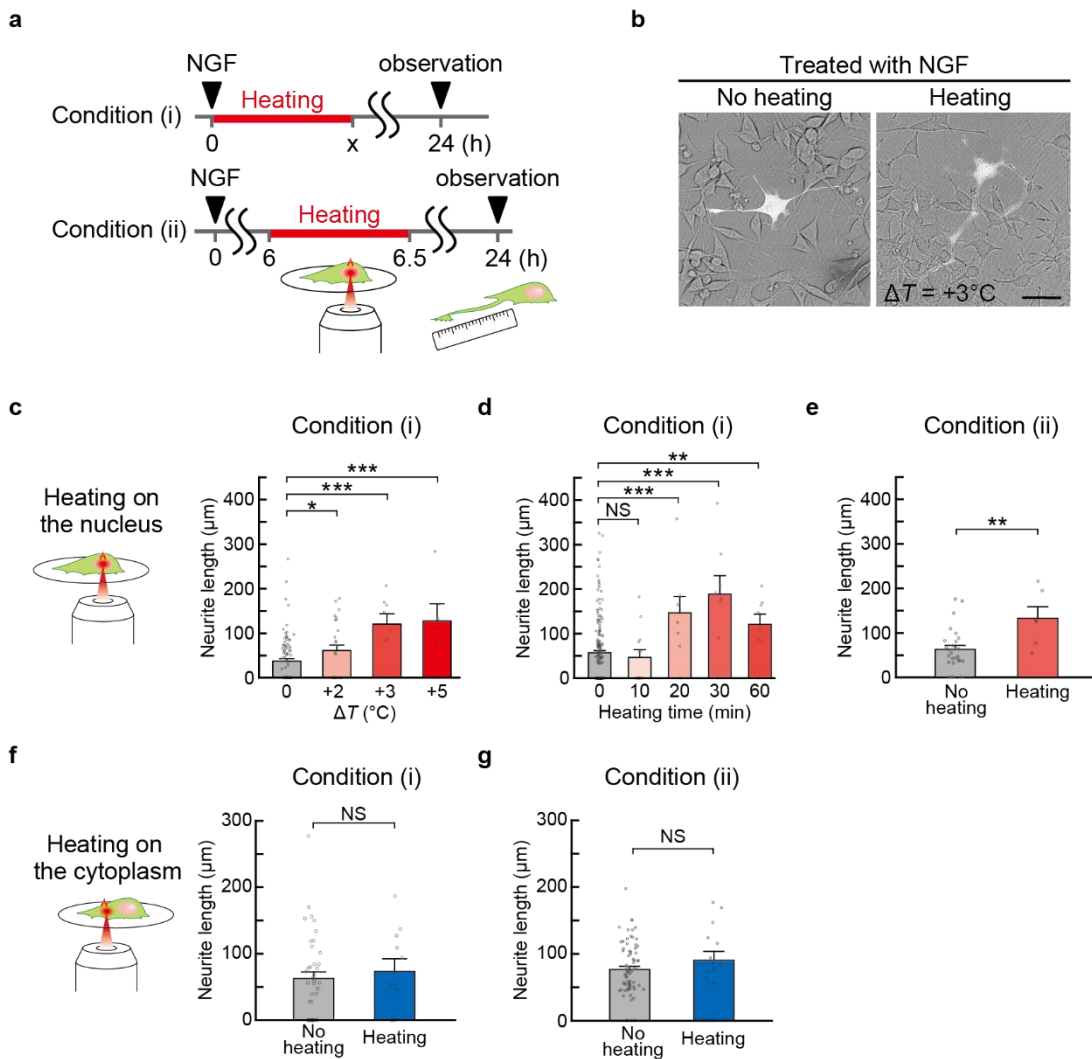
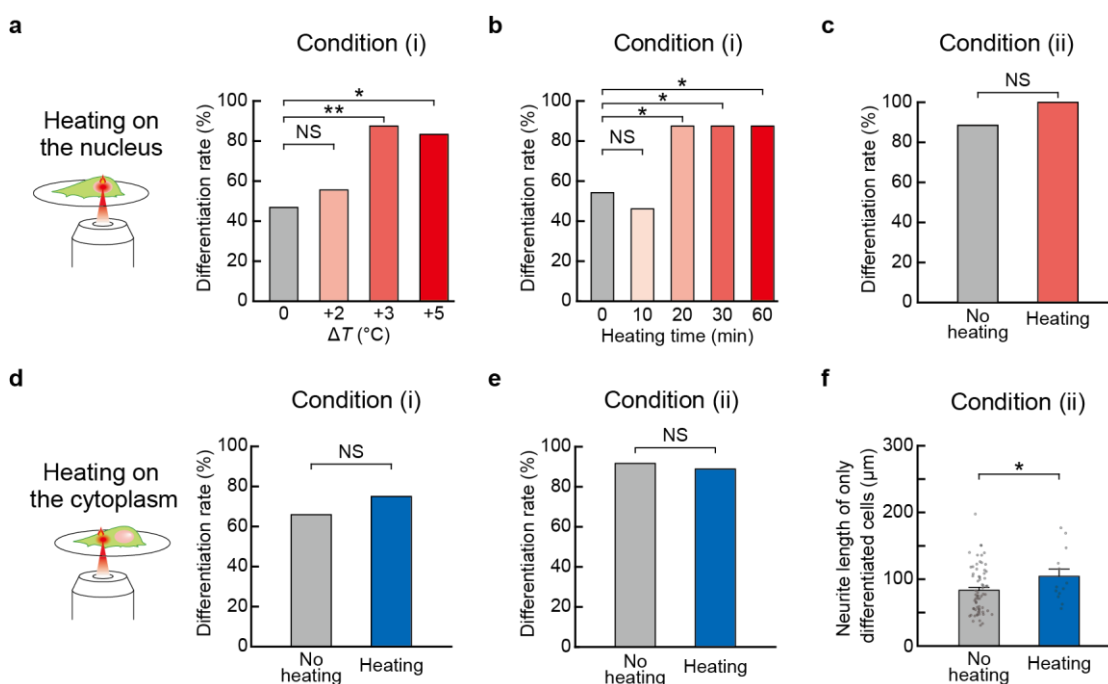
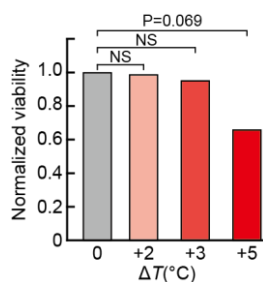


図 16. NGF によって誘導された PC12 細胞の神経分化過程における局所的な細胞内加熱による神経突起伸長の促進 (a) 局所的な細胞内加熱の実験の流れ。条件 (i) : NGF 処理後、核または細胞質を一定時間加熱し、NGF 処理 24 時間後に神経突起の長さを測定した。条件 (ii) : NGF 処理 6 時間後に核または細胞質を 30 分間加熱し、NGF 処理 24 時間後に神経突起長を測定した。(b) NGF 処理 24 時間後の細胞。明視野画像と TR-Dex (細胞形態追跡のために注入) の蛍光画像を合成した。スケールバーは 50 μm を表す。(c) NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する IR レーザー加熱 (一定時間: 1 時間) の強度の影響。データは条件(i)で得られ、means \pm s.e.で示した (n = 96 細胞 [加熱なし]、27 細胞 [$\Delta T = +2^\circ\text{C}$]、8 細胞 [$\Delta T = +3^\circ\text{C}$]、6 細胞 [$\Delta T = +5^\circ\text{C}$])。 (d) 条件(i)における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する IR レーザー加熱 (一定強度: $\Delta T = +3^\circ\text{C}$) の持続時間の影響。データは means \pm s.e.で示した (n = 188 細胞 [加熱なし]、13 細胞 [加熱時間: 10 分]、8 細胞 [加熱時間: 20 分、30 分、60 分])。 (e) 条件(ii)における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する核加熱 ($\Delta T = +3^\circ\text{C}$ 、加熱時間 30 分) の影響。データは means \pm s.e.で示した (n = 27 細胞 [加熱なし] および 6 細胞 [加熱])。 (f) 条件(i)における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する細胞質加熱 ($\Delta T = +3^\circ\text{C}$ 、加熱時間 30 分) の影響。データは means \pm s.e.で示した (n = 40 細胞 [加熱なし] および 11 細胞 [加熱])。 (g) 条件(ii)における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する細胞質加熱 ($\Delta T = +3^\circ\text{C}$ 、加熱時間 30 分) の影響。データは means \pm s.e.で示した (n = 73 細胞[加熱なし]と 15 細胞[加熱])。 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (unpaired Student's *t*-test)。 NS は有意差が無いことを示す。

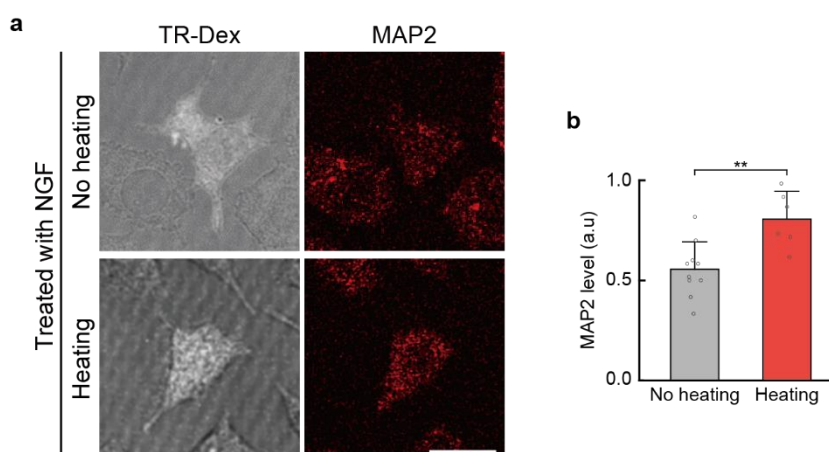


補足図 S4. PC12 細胞の NGF による神経分化誘導における神経突起伸長率に対する細胞内局所加熱の影響。 (a) NGF 処理 24 時間後の分化速度に対する IR レーザー加熱 (一定時間: 1 時間) の強度の影響。データは条件(i)で取得し、平均値 \pm 標準誤差 (s.e.) で示した (n = 96 細胞 [加熱なし]、27 細胞 [$\Delta T = +2^\circ\text{C}$]、8 細胞 [$\Delta T = +3^\circ\text{C}$]、6 細胞 [$\Delta T = +5^\circ\text{C}$])。 (b) 条件(i)における NGF 処理 24 時間後の分化率に

対する IR レーザー加熱（一定強度： $\Delta T = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）の持続時間の影響。データは means \pm s.e. で示した（ $n = 188$ 細胞 [加熱なし]、13 細胞 [加熱時間：10 分]、8 細胞 [加熱時間：20 分、30 分、60 分]）。(c) 条件(ii)における NGF 処理 24 時間後の分化率に対する核加熱（ $\Delta T = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、加熱時間 30 分）の影響。データは means \pm s.e. で示した（ $n = 27$ 細胞 [加熱なし] と 6 細胞 [加熱]）。(d) 条件(i)の NGF 処理 24 時間後の分化率に対する細胞質加熱（ $\Delta T = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、加熱時間 30 分）の影響。データは means \pm s.e. で示した（ $n = 40$ 細胞 [加熱なし] および 11 細胞 [加熱]）。(e) 条件(ii)における NGF 処理 24 時間後の分化率に対する細胞質加熱（ $\Delta T = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、加熱時間 30 分）の影響。データは means \pm s.e. で示した（ $n = 73$ 細胞 [加熱なし] および 15 細胞 [加熱]）。(f) 条件(ii)における NGF 処理 24 時間後の神経突起の長さに対する細胞質加熱（ $\Delta T = +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、加熱時間 30 分）の影響。データは means \pm s.e. で示した（ $n = 67$ 細胞 [加熱なし] および 13 細胞 [加熱]）。図 16g の突起伸長した細胞からのデータのみをプロットした（長さ 0 の結果は除外した）。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (unpaired Student's *t*-test.)。NS は有意差が無いことを示す。



補足図 S5.各レーザー強度による温度上昇における細胞生存率



補足図 S6. NGF による神経分化誘導中の核内加熱に対する MAP2 の発現の影響 (a) NGF 添加直後の加熱の有無による 24 時間後の PC12 細胞の明視野および免疫蛍光像。スケールバーは 25 μm を表す。(b) 加熱の有無による細胞内の MAP2 レベルの定量。** $P < 0.01$ (unpaired Student's *t*-test.)。

4-5. NGF 非存在下での細胞内局所加熱による神経突起伸長の誘導

核内の温度上昇が分化を誘導する因子であるかどうかを調べるため、様々な化学シグナル伝達経路を活性化する NGF で処理することなく、核内の加熱が PC12 細胞の神経突起伸長を誘導するかどうかを調べた (図 17a)。核内の局所加熱 ($\Delta T=3^{\circ}\text{C}$ 、30 分) 後、細胞を NGF 処理なしで 24 時間培養した。その後、神経突起伸長が形成されるかどうか調べた (図 17b)。その結果、核を 30 分間局所加熱すると、神経突起を形成する細胞の割合が有意に増加した (図 17c、d)。これらの結果は、核の局所的な温度上昇が神経細胞の分化を直接誘導することを示唆している。NGF 非存在下での加熱による効果は、核における局所的な温度上昇自体が神経細胞分化の引き金として機能することを示唆している。これは、温度上昇によってすでに進行中の細胞内反応が加速されるのではなく、分子レベルやその複雑な状態の変化を介して活性化されるトリガーとして機能するのかもしれない。

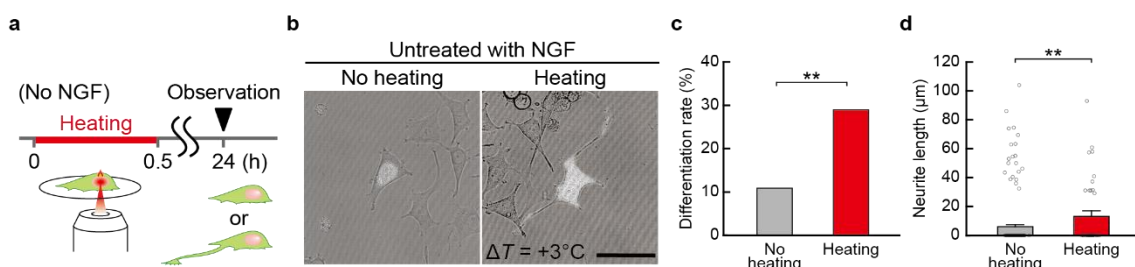


図 17. NGF 非存在下での細胞内局所加熱による PC12 細胞の神経突起伸長の誘導 (a) 局所細胞内加熱実験のタイムフロー。核を 30 分間加熱し、24 時間後に神経突起の長さを測定した。(b) 核を加熱 ($\Delta T=+3^{\circ}\text{C}$ 、30 分間) してから 24 時間後の細胞。明視野画像と TR-Dex の蛍光画像を合成した。スケールバーは 50 μm を表す。(c) NGF 非存在下で核を加熱してから 24 時間後の神経突起伸長率。(d) NGF 非存在下で核を加熱してから 24 時間後の神経突起の長さ。184 細胞 (加熱なし) と 38 細胞 (加熱) の細胞を解析した。** $P < 0.01$ (unpaired Student's *t*-test.)。

4-6. 神経分化過程における細胞内温度上昇

近年、細胞内の自発的な温度変化が脳/神経機能と関連している 38-40。そこで、PC12 細胞において、神経細胞分化の過程で自発的な温度変化が起こるかどうかを調べた。細胞内温度は、FPT と FND を用いて神経分化の前後で測定した (図 14c)。FPT_{Low} を用いた細胞内温度イメージングにより、分化前の PC12 細胞では核の温度が細胞質の温度よりも高いことが示され、これは先行研究 34,35,41 と一致していた。NGF 添加により分化した細胞では、細胞内温度は細胞全体で上昇した (図 18a、b、補足図 S7)。検量線 (図 14d) を用いて細胞内コンパートメントの平均温度変化を算出したところ、細胞全体 ($\Delta T=+1.4^{\circ}\text{C}$)、核 ($\Delta T=+0.9^{\circ}\text{C}$)、細胞質 ($\Delta T=+1.6^{\circ}\text{C}$) の温度上昇が観察された (図 18b、c)。正電荷を帯びた PEI-FNDs (polyethyleneimine [PEI] で表面修飾した FNDs) を用いた細胞内温度測定でも、同様の

分化依存的な温度上昇が見られた (図 18d, e)。対照的に、細胞膜の外表面に配置した負電荷を帯びた未修飾の FND を用いて温度測定を行った場合には、温度上昇は観察されなかった (補足図 S8)。FPT と FND の温度感知原理は異なるが、どちらの温度計も、神経細胞の分化過程において、細胞内の自発的な温度上昇を伴っていることを明らかにした。

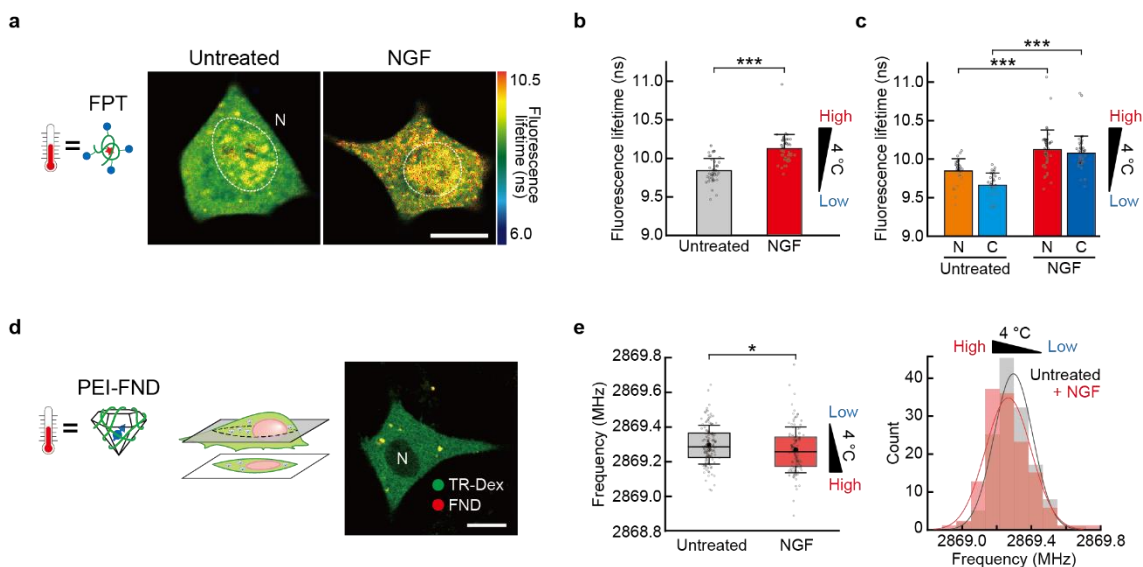
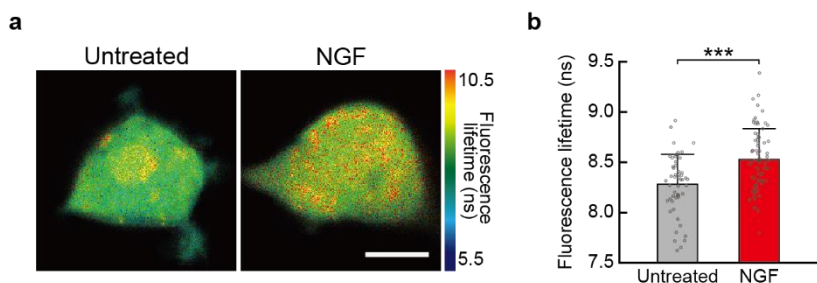
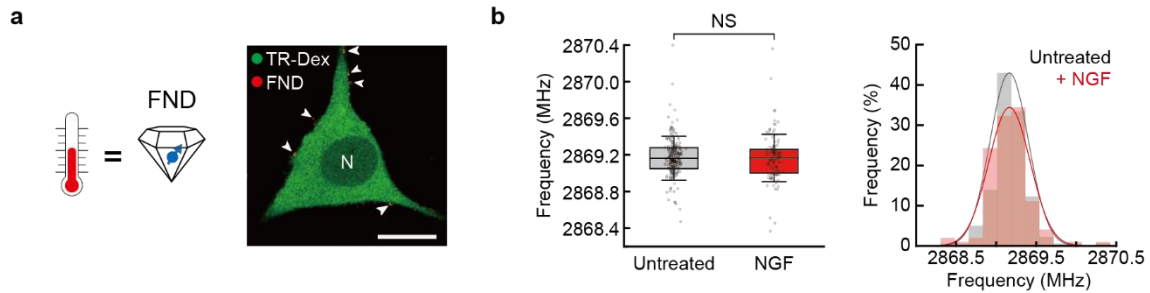


図 18. PC12 細胞の神経分化過程における細胞内温度の上昇 (a) FPT_{Low} を用いた神経分化前後の細胞内温度マッピング。(b, c) 未処理細胞または NGF 処理細胞の細胞全体(b)、核(N)、細胞質(C) (c)における FPT_{Low} の蛍光寿命。データは $means \pm s.d.$ で示した ($n=40$ 細胞 [未処理]、 44 細胞 [NGF])。 (d) PEI-FND を組み込んだ細胞 (右) の共焦点蛍光画像。緑は TR-Dex (細胞形態可視化のために注入)、赤は PEI-FNDs。 (e) PEI-FNDs の ODMR を用いた神経分化過程における細胞内温度測定。未処理細胞 ($n = 136$ particles in 10 cells) および NGF 処理細胞 ($n = 118$ particles in 12 cells) における PEI-FND の D (T) の共鳴周波数の散布図 (左; データは $means \pm s.d.$ 、boundaries of the box being the 25% and 75% percentiles) およびヒストグラム (右)。培地の温度は $30^{\circ}C$ に維持した。スケールバーは $10 \mu m$ を表す。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t -test.)。N は核を示す。



補足図 S7. FPT_{High} を用いた神経分化過程における細胞内温度測定 (a) 神経細胞分化前後の細胞内温度マッピング。スケールバーは $10 \mu m$ を表す。(b) 未処理細胞または NGF で処理した細胞の蛍光寿命。データは $means \pm standard deviations (s.d.)$ ($n = 52$ [untreated] and 72 [NGF] cells) で示した。培地の温度は 37

±0.1°C に維持した。*** $P < 0.001$ (unpaired Student's t -test)。



補足図 S8. 未修飾 FND を用いた分化過程における細胞外表面の温度測定 (a) 細胞膜に接着した FND の共焦点蛍光画像。緑はテキサスレッド標識デキストラン (TR-Dex、細胞形態可視化のために注入)、赤は FND。白矢印は FND の位置を示す。スケールバーは 10 μm を表す。(b) FNDs の ODMR を用いた神経分化中の温度測定。未処理細胞 (13 細胞中 $n = 203$ 粒子) および NGF 処理細胞 (9 細胞中 $n = 112$ 粒子) における FNDs の D (T) の共鳴周波数の散布図 (左; データは means \pm s.d. with boundaries of the box being the 25% and 75% percentiles) およびヒストグラム (右)。培地の温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ に保った。NS は有意差が無いことを示す。

4-7. 神経分化時の細胞内温度上昇における細胞内反応の関与

神経分化の過程で PC12 細胞に観察される温度上昇に、どの細胞内反応が関与しているかを調べるため、神経分化に関連する細胞内反応の阻害剤存在下での細胞内温度変化を測定した。転写、翻訳、アクチン重合は、神経細胞分化を担う主要な細胞内反応である。これらの反応をそれぞれ、Actinomycin D (0.8 μM)、Cycloheximide (1.0 μM)、Cytochalasin D (0.5 μM) を用いて阻害すると、阻害剤添加 24 時間後に神経突起伸長が有意に抑制された (図 19a, b)。アクチノマイシン D による転写阻害効果が弱かったのは、半減期の長い mRNA が細胞内に残っていた可能性がある。FPT_{Low} を用いた細胞内温度測定によると、前述の通り、阻害剤処理の非存在下である分化した細胞は未分化の細胞に比べて細胞内温度の上昇を示した。一方で、転写、翻訳、アクチン重合を抑制して分化を阻害した細胞では、核と細胞質に温度上昇は見られなかった (図 19c, d)。転写阻害は核と細胞質の温度に有意な影響を与えたが、翻訳阻害は核の温度変化よりも細胞質の温度に影響を与えた (図 19d)。転写と翻訳がそれぞれ核と細胞質で起こることを考えると、転写と翻訳の阻害による温度の低下は、特定の遺伝子産物の機能ではなく、転写と翻訳 (およびそれらに関連する反応) が熱源であることを示している。さらに、転写と翻訳を阻害すると、温度が未処理の定常状態よりも低下したことから、これらの区画の温度は定常状態でも熱発生によって高いレベルに維持されていることが示唆された。アクチン重合の阻害は、定常状態以上の温度上昇を抑制しなかったが、NGF 依存的な温度上昇を抑制したことから、神経分化過程におけるアクチン重合

やアクチン線維関連反応が、直接的あるいは間接的に熱発生に関与していることが示唆された。以上の結果から、神経細胞分化時の細胞内温度上昇には、細胞内の転写、翻訳、アクチン重合反応が関与していることが示された。

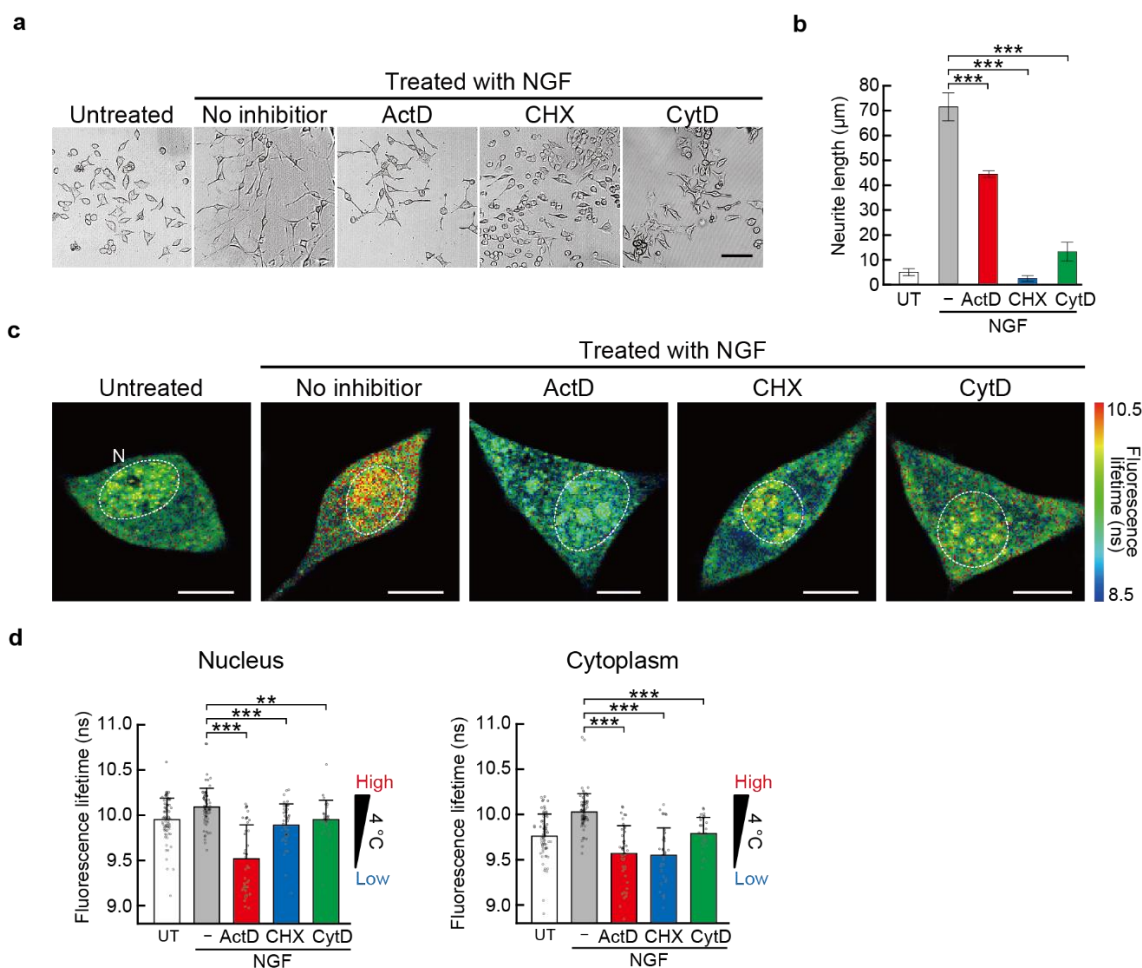
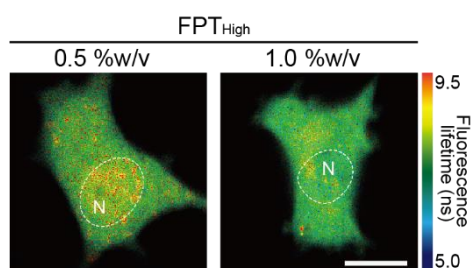


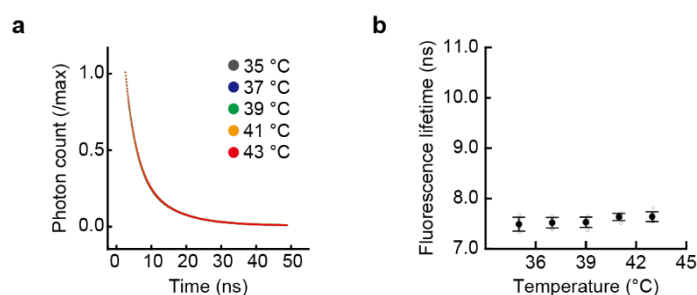
図 19. PC12 細胞の神経分化過程における細胞内温度上昇への細胞内反応の関与 (a) NGF および阻害剤処理 24 時間後の細胞の明視野像。スケールバーは 100μm を表す。(b) NGF および阻害剤処理 24 時間後の神経突起の長さ。データは means±s.e で示す (n=97-180 細胞)。UT: 未処理、ActD: アクチノマイシン D、CHX: シクロヘキシミド、CytD: サイトカラシン D。(c) NGF および阻害剤処理 24 時間後の細胞内温度マッピング。スケールバーは 10 μm を表す。N は核を示す。(d) NGF および阻害剤処理 24 時間後の細胞における FPT_{Low} の平均蛍光寿命。データは mean ± s.d. で示した (n = 70 細胞[UT]、71 細胞[NGF]、45 細胞[ActD]、42 細胞[CHX]、31 細胞[CytD])。**P < 0.01, ***P < 0.001 (unpaired Student's t-test)。(c, d) 培地の温度は 30°C に維持した。

4-8. NGF による神経分化過程での細胞内温度上昇抑制による神経突起伸長の阻害

高濃度の FPT_{High} を細胞内に導入したときの NGF 誘導性突起の形成を解析することにより、細胞内温度の局所の上昇が神経分化中の神経突起伸長に必須であるかどうかを調べた。導入された FPT_{High} は大量の熱を吸収し⁵¹、局所的な細胞内温度の上昇を抑制した（補足図 S9）。FPT_{High} または熱吸収しない Control copolymer（CP：補足図 S10）導入後 24 時間培養した細胞について、NGF 添加直後に行った分化率（神経突起の形成率）と神経突起長を調べた（図 20a）。CP 処理細胞は NGF 添加により神経突起を形成したが（TR-Dex 処理細胞と同等）、FPT_{High} を注入した細胞では神経突起形成率（図 20b）と神経突起伸長（図 20c）が著しく抑制された。さらに、FPT_{High} によって神経突起伸長が抑制された細胞に IR レーザーを照射した後、核加熱（150 μ W、30 分間）を行った。これにより、神経突起伸長が部分的に回復した（図 20d-f）。加熱による神経突起伸長の部分的な回復は、最適でない加熱条件（加熱の強度、時間、場所）、あるいは加熱以外の要因による FPT_{High} による部分的な弊害が原因であったと推測される。この結果から、NGF 処理による分化過程における神経突起伸長には、局所的な細胞温度の上昇が必要であることが示唆された。



補足図 S9. 通常濃度（0.5% w/v）と高濃度（1% w/v）の FPT_{High} を用いた温度マッピング培地の温度は 37°C に維持した。スケールバーは 10 μ m を表す。



補足図 S10. PC12 細胞における control copolymer（CP）の温度非依存蛍光寿命 (a) 各温度における control copolymer の蛍光減衰曲線。(b) control copolymer の蛍光寿命と温度との関係。

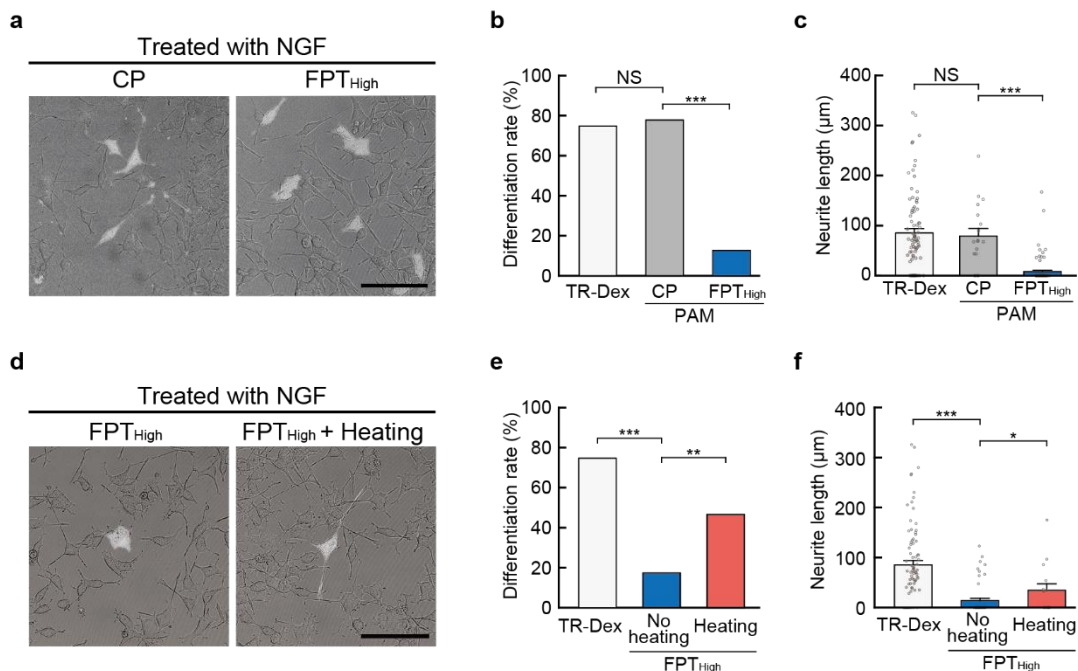


図 20. NGF による神経分化過程における細胞内温度上昇の抑制による神経突起伸長の抑制
(a) NGF 処理 24 時間後の細胞の代表的な画像。control copolymer (CP, 左) または FPT_{High} (右) を含む細胞の明視野像と蛍光像を合成した。スケールバーは 100 μm を表す。**(b, c)** NGF 処理 24 時間後の神経突起の伸長率 **(b)** と長さ **(c)**。データは means ± s.e. で示した。TR-Dex (細胞トレーサー) については、83 個の細胞を分析した。polyacrylamides (PAM) については、18 細胞 (CP) と 87 細胞 (FPT_{High}) を分析した。
(d) 24 時間の NGF 処理と FPT_{High} 注入後の細胞の代表的な画像。写真は、核 (右) を加熱 (ΔT = +3°C、30 分間) してから 24 時間後に撮影された。細胞内の FPT_{High} の明視野像と蛍光像を合成した。**(e, f)** NGF 処理 24 時間後の神経突起の伸長率 **(e)** と長さ **(f)**。データは means ± s.e. で示した。TR-Dex では 83 個の細胞を解析した。FPT_{High} については、52 細胞 (加熱なし) と 15 細胞 (核を加熱) を解析した。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (unpaired Student's *t*-test)。NS は有意差が無いことを示す。

4-9. マウス大脳皮質初代ニューロンの神経突起伸長における温度シグナルの寄与

最後に、PC12 細胞で明らかにされた神経突起伸長に対する細胞内温度上昇の寄与が、in vivo でも起こるかどうかをマウスの初代大脳皮質神経細胞を用いて調べた。まず、神経回路形成・神経突起伸長中 [試験管内日数 days in vitro (DIV) 1, 4, 8, 12, 16 : 図 8a] に、FPT_{High} を用いて神経細胞の細胞内温度を測定した。その結果、細胞内温度は培養日数の経過とともに上昇し、その間に神経突起は著しく伸長した (図 8b, c)。そこで、過剰量の FPT_{High} を導入することで、この神経細胞内在性の局所的な細胞内温度の上昇を抑制したところ、同量の Control copolymer (CP) を導入した神経細胞と比較して、神経突起の伸長が抑制された。このことは、神経突起伸長には細胞内温度の局所の上昇が必要であることを示唆している (図 8d, e)。これらの結果は PC12 細胞で得られた結果と同様であり、細胞内温度の上昇がマウ

ス初代皮質ニューロンの神経突起伸長に寄与していることを示唆している。

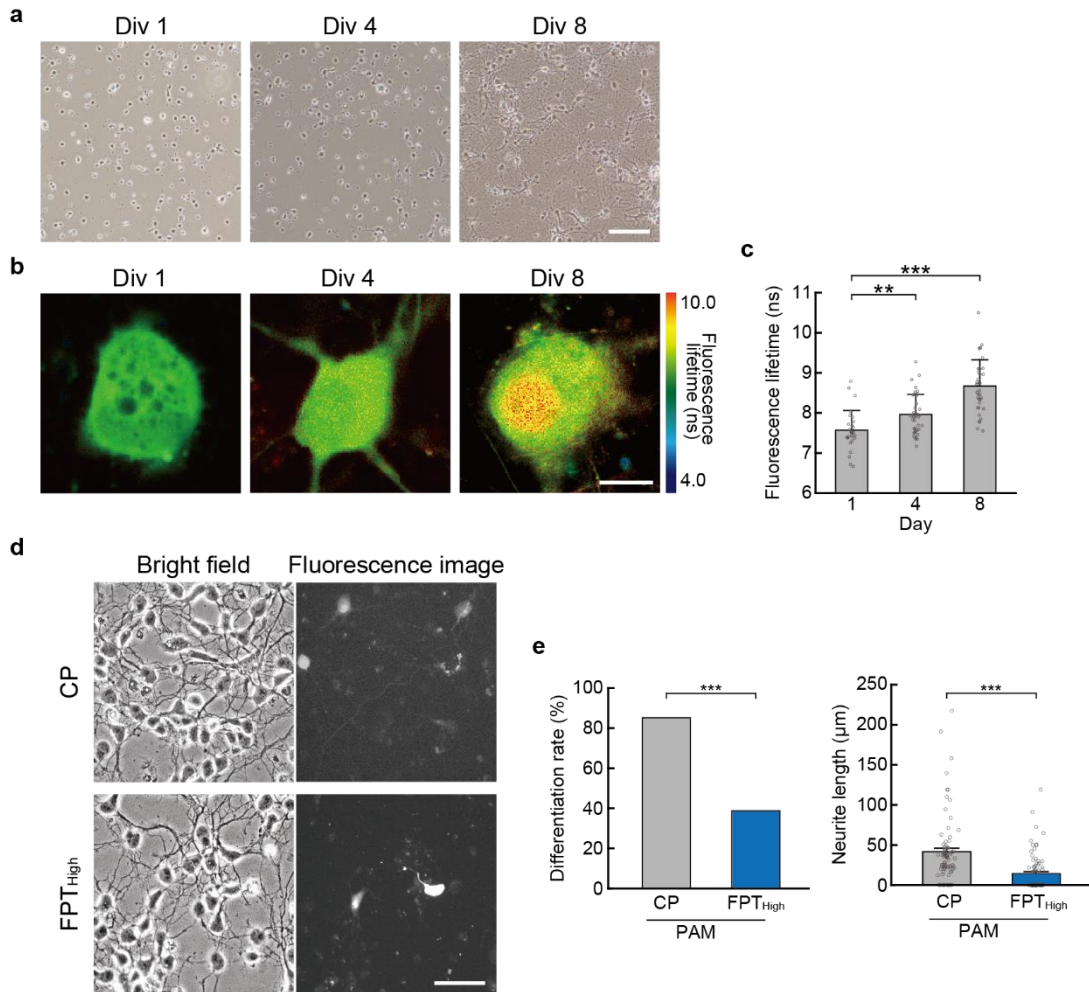


図 21. マウス初代大脳皮質ニューロンの神経突起伸長における温度シグナリング (a-c) 明視野画像(a)、代表的な細胞内温度マッピング(b)、および day *in vitro* (Div)のニューロンの FPT_{High}の平均蛍光寿命データは means ± s.d.で示した(c)。スケールバーは 100 μm (a) と 10 μm (b) を表す。(d) ポリマー (CP または FPT_{High}) 導入 24 時間後の神経細胞。スケールバーは 50 μm を表す。(e) ポリマー導入 24 時間後の神経突起の伸長率と長さ。データは means ± s.e.で示した。PAM については、80 (CP) 細胞と 81 (FPT_{High}) 細胞を解析した。

5. 結論と今後の展望

5-1. 結果まとめ

本研究では、PC12 細胞とマウス大脳皮質初代ニューロンの温度を局所的に操作し観察することで、細胞内の自発的な温度変化が神経分化に及ぼす影響を調べた。赤外レーザー照射による局所的 (<5 μ m) 加熱に対する細胞応答を調べた結果、ある一定時間 (すなわち 20 分以上) とある一定の加熱強度 (すなわち 3 $^{\circ}$ C) の局所的な温度上昇 (特に核内) が、神経分化の過程で神経突起の伸長を促進または誘導することが明らかになった。さらに、FPT と FND を用いた細胞内温度測定から、神経細胞の分化過程には自発的な細胞内温度上昇が伴うことが示された。さらに、核における転写や細胞質における翻訳などの反応が、神経細胞分化過程における発熱に大きな影響を及ぼしていた。最後に、FPT_{High} の過剰投与による局所的な温度上昇の抑制から、細胞内の局所的な発熱が神経突起の伸長に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5-2. 本研究の新規性

細胞内温度が関与する神経細胞分化メカニズムを研究するための本研究の新規性は、細胞内の温度操作ために開発した方法とそれにより明らかにした細胞内温度を介した神経分化機構にある。方法については、細胞内区画 (すなわち核と細胞質) を選択的にターゲットとする赤外レーザーを用いた人工的かつ定量的な加熱法を適用することで、各区画が突起伸長を促進する異なる温度反応を示すことを見出した。培地温度²³⁻²⁵ や細胞外部の加熱による外部温度勾配を操作することで細胞全体の温度上昇による影響を調べた先行研究^{26,27} とは異なり、本研究のアプローチは、高解像度の細胞内温度イメージングによる個々の細胞内コンパートメントの温度測定と組み合わせることで、細胞内の各領域における温度変化の重要性を検証することができた。最近 Choi らは、単一細胞のアプローチを用いて、線虫胚の細胞分裂に対する細胞内熱の影響を調べた⁴³。本研究は、このエレガントなアプローチを細胞内区画に拡張できることを示している。さらに、高感度温度計を用いた加熱強度の正確なキャリブレーションにより、細胞内の領域で約 1.3 $^{\circ}$ C~8.0 $^{\circ}$ C の定量的な加熱が可能になった (これは細胞全体で平均すると約 0.2 $^{\circ}$ C~1.5 $^{\circ}$ C に相当する)。特に、神経突起伸長を最も効率的に誘導する加熱条件 (レーザー照射領域では 3 $^{\circ}$ C、細胞全体では 0.5 $^{\circ}$ C) は、非侵襲的で、生理的な温度変動の大きさに類似していた。これらの知見は、狭い温度範囲で活動する恒温動物における生理的発熱の機能を調べる上で非常に重要である。

5-3. 本研究の考察および展望

本研究から、PC12 細胞の核を非侵襲的に加温することで、NGF による神経突起伸長が促進されること (図 16)、この核加温のみでも、NGF 非存在下で神経突起伸長が誘導されることが明らかになった (図 17)。また、PC12 細胞の神経分化過程において、核の温度が自然に上昇するだけでなく (図 18)、核に特徴的な生化学反応である転写が、この温度上昇に大きく関与していることも見いだした (図 19)。神経突起の伸長には、この細胞内反応の刺激による細胞内温度上昇が必要であった (図 20)。さらに、マウスの初代大脳皮質神経細胞においても、細胞内温度の上昇が神経突起伸長に寄与していた (図 21)。これらの結果から、核内での生理的な発熱が、転写の正の制御を介して、神経細胞分化の過程で神経突起伸長を促進するというモデルを提唱した。すなわち、本研究では神経細胞分化における細胞内温度シグナリングの存在を明らかにした。

神経分化過程における局所加熱に対する応答は、環境温度の上昇が神経分化を促進するという報告^{23-25,29}と一致している。本研究から、生理的な温度上昇に対する応答には主に核が関与しており、熱は細胞自律的に発生することが明らかになった。NGF が転写に関連する数多くの分子カスケードを活性化する⁷⁹ことを考慮すると、今回の結果は、熱がこれらの分子カスケードにおける全て、あるいはいくつかの特定の反応を促進すること (図 16)、あるいはカスケードにおけるシグナルとして作用すること (図 17) を示唆している。すなわち、すでに進行している細胞内反応を促進する効果に加えて、熱そのものが (分子やその複合体の状態の変化などを介して) 引き金になっていると考えられる。このような温度シグナル伝達機構は、刺激に応じて転写を飛躍的に活性化させる可能性がある。

熱を介した神経分化の促進や、発生した生理的な熱による転写へのポジティブフィードバックの可能性の根底にある分子メカニズムの徹底的な解明には、特定の分子の加熱や核内の局所的な温度上昇の抑制など、細胞内の局所温度操作技術の進歩が必要である。

また、神経細胞分化の過程で、翻訳反応とアクチン重合に起因する熱が細胞質で発生することも発見した (図 19)。その結果、細胞質の加熱は、核の加熱ほど効率的ではないものの、神経突起の伸長をわずかに促進することが明らかになった (図 16、補足図 S4)。このことは、温度シグナルによって翻訳が活性化されることを示唆している。この活性化をさらに調べるためには、核よりも大きな細胞質における効果的な加熱方法 (場所、時間、タイミング) の開発とその最適化が必要である。

これまでの報告では、有害な細胞外温度変化^{23,24,28} (ヒートショックなど) や穏やかな細胞外温度刺激³³ が神経突起伸長に及ぼす影響について論じられてきた。今回我々は、細胞内在性の発熱が間接的あるいは直接的に神経突起伸長を促進することを示した。この結果は、これまで生化学反応の単なる副産物と考えられてきたものが、細胞内で自発的に発生する熱が、細胞内反応の駆動力として機能していることを示唆している。そのため、生理学的な条件下でも、温度シグナリングが高効率の神経突起伸長をもたらす可能性があると考えられる。例えば、器官形成の重要な時期 (受精後 2~8 週間) に体温が自然に上昇すると³⁴、

胎児の神経回路の形成が促進される可能性がある。さらに、神経突起の伸長を誘導するのに必要な細胞内の場所（核）や加熱のタイミングなど、本研究の関連知見は、神経新生が不可欠なリハビリテーションや神経再生療法の開発に貢献する可能性がある。

細胞内温度変化を介した神経細胞分化の詳細な分子メカニズムを解明することは、複雑な神経細胞分化のメカニズムとその意義についての理解を深めることになるだろう。細胞内の自発的な温度変化によって神経細胞の分化が促進されるという今回の発見は、神経分化というダイナミックで複雑な細胞現象が、これまでの研究で提案されながら確認されていなかった、温度シグナリングの新しいメカニズム⁴²のひとつであることを示唆している。

6. 参考文献

1. Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112–117 (2001).
2. Arimura, N. & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 194–205 (2007).
3. Yogev, S. & Shen, K. Establishing neuronal polarity with environmental and intrinsic mechanisms. *Neuron* **96**, 638–650 (2017).
4. Bond, A. M., Ming, G. L. & Song, H. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later. *Cell Stem Cell* **17**, 385–395 (2015).
5. Bäckman, C. *et al.* Systemic administration of a nerve growth factor conjugate reverses age-related cognitive dysfunction and prevents cholinergic neuron atrophy. *J. Neurosci.* **16**, 5437–5442 (1996).
6. Burns, T. C. & Quinones-Hinojosa, A. Regenerative medicine for neurological diseases - Will regenerative neurosurgery deliver? *BMJ* **373**, n955 (2021).
7. Skaper, S. D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: An Overview. *Methods Mol. Biol.* **846**, 1–12 (2012).
8. Park, H. & Poo, M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 7–23 (2013).
9. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **361**, 1545–1564 (2006).
10. Clark, S. E., Moss, D. J. & Bray, D. Actin polymerization and synthesis in cultured neurones. *Exp. Cell Res.* **147**, 303–314 (1983).
11. Zhou, F. Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y. H. & Snider, W. D. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* **42**, 897–912 (2004).
12. Yuan, X. B. *et al.* Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat. Cell Biol.* **5**, 38–45 (2003).
13. Lowery, L. A. & Vactor, D. Van. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 332–343 (2009).
14. Shibasaki, K., Murayama, N., Ono, K., Ishizaki, Y. & Tominaga, M. TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J. Neurosci.* **30**, 4601–4612 (2010).
15. de Vincentiis, S. *et al.* Extremely low forces induce extreme axon growth. *J. Neurosci.* **40**, 4997–5007 (2020).
16. Cheng, H., Huang, Y., Yue, H. & Fan, Y. Electrical stimulation promotes stem cell neural differentiation in tissue engineering. *Stem Cells Int.* **2021**, 6697574 (2021).
17. Xu, K. *et al.* Effect of electrical and electromechanical stimulation on PC12 cell proliferation and

- axon outgrowth. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 757906 (2021).
18. Black, B. J., Gu, L. & Mohanty, S. K. Highly effective photonic cue for repulsive axonal guidance. *PLoS One* **9**, e86292 (2014).
 19. Black, B., Mondal, A., Kim, Y. & Mohanty, S. K. Neuronal beacon. *Opt. Lett.* **38**, 2174 (2013).
 20. Kao, Y.-C., Liao, Y.-C., Cheng, P.-L. & Lee, C.-H. Neurite regrowth stimulation by a red-light spot focused on the neuronal cell soma following blue light-induced retraction. *Sci. Rep.* **9**, 18210 (2019).
 21. Wang, J. L., Lin, Y. C., Young, T. H. & Chen, M. H. Far-infrared ray radiation promotes neurite outgrowth of neuron-like PC12 cells through AKT1 signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* **118**, 600–610 (2019).
 22. Hoshi, Y., Shibasaki, K., Gailly, P., Ikegaya, Y. & Koyama, R. Thermosensitive receptors in neural stem cells link stress-induced hyperthermia to impaired neurogenesis via microglial engulfment. *Sci. Adv.* **7**, eabj8080 (2021).
 23. Blasa, S. *et al.* Prussian blue nanoparticle-mediated scalable thermal stimulation for in vitro neuronal differentiation. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **12**, 2304 (2022).
 24. Antonova, O. Y., Kochetkova, O. Y. & Kanev, I. L. Light-to-heat converting ECM-mimetic nanofiber scaffolds for neuronal differentiation and neurite outgrowth guidance. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **12**, 2166 (2022).
 25. Kudo, T. *et al.* Induction of neurite outgrowth in PC12 cells treated with temperature-controlled repeated thermal stimulation. *PLoS One* **10**, e0124024 (2015).
 26. Oyama, K. *et al.* Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater. *Sci. Rep.* **5**, 16611 (2015).
 27. Black, B. *et al.* Spatial temperature gradients guide axonal outgrowth. *Sci. Rep.* **6**, 29876 (2016).
 28. Read, D. E., Reed Herbert, K. & Gorman, A. M. Heat shock enhances NGF-induced neurite elongation which is not mediated by Hsp25 in PC12 cells. *Brain Res.* **1221**, 14–23 (2008).
 29. Hossain, M. E. *et al.* Direct exposure to mild heat promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro. *PLoS One* **12**, e0190356 (2017).
 30. Refinetti, R. & Menaker, M. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol. Behav.* **51**, 613–637 (1992).
 31. Cagnacci, A., Soldani, R., Laughlin, G. A. & Yen, S. S. C. Modification of circadian body temperature rhythm during the luteal menstrual phase: Role of melatonin. *J. Appl. Physiol.* **80**, 25–29 (1996).
 32. Rzechorzek, N. M. *et al.* A daily temperature rhythm in the human brain predicts survival after brain injury. *Brain* **145**, 2031–2048 (2022).
 33. Kiyatkin, E. A. Brain temperature and its role in physiology and pathophysiology: Lessons from 20 years of thermorecording. *Temperature* **6**, 271–333 (2019).
 34. Hartgill, T. W., Bergersen, T. K. & Pirhonen, J. Core body temperature and the thermoneutral zone:

- A longitudinal study of normal human pregnancy. *Acta Physiol.* **201**, 467–474 (2011).
35. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
 36. Okabe, K., Sakaguchi, R., Shi, B. & Kiyonaka, S. Intracellular thermometry with fluorescent sensors for thermal biology. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **470**, 717–731 (2018).
 37. Zhou, J., del Rosal, B., Jaque, D., Uchiyama, S. & Jin, D. Advances and challenges for fluorescence nanothermometry. *Nat. Methods* **17**, 967–980 (2020).
 38. Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S. & Inada, N. A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. *PLoS One* **10**, e0117677 (2015).
 39. Hoshi, Y. *et al.* Ischemic brain injury leads to brain edema via hyperthermia-induced TRPV4 activation. *J. Neurosci.* **38**, 5700–5709 (2018).
 40. Petrini, G. *et al.* Nanodiamond-quantum sensors reveal temperature variation associated to hippocampal neurons firing. *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Ger.)* **9**, e2202014 (2022).
 41. Tanimoto, R. *et al.* Detection of temperature difference in neuronal cells. *Sci. Rep.* **6**, 22071 (2016).
 42. Okabe, K. & Uchiyama, S. Intracellular thermometry uncovers spontaneous thermogenesis and associated thermal signaling. *Commun. Biol.* **4**, 1377 (2021).
 43. Choi, J. *et al.* Probing and manipulating embryogenesis via nanoscale thermometry and temperature control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 14636–14641 (2020).
 44. Ermakova, Y. G. *et al.* Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution. *Nat. Commun.* **8**, 15362 (2017).
 45. Marino, A. *et al.* Gold nanoshell-mediated remote myotube activation. *ACS Nano* **11**, 2494–2505 (2017).
 46. Takeharu Sekiguchi, Shingo Sotoma, and Yoshie Harada. Fluorescent nanodiamonds as a robust temperature sensor inside a single cell. *Biophys. Physicobiology* **15**, 229–234 (2018).
 47. Kiyosue, K. & Miwa, Y. Epstein-Barr virus-derived vector suitable for long-term expression in neurons. *Heliyon* **6**, e03504 (2020).
 48. Kamei, Y. *et al.* Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nat. Methods* **6**, 79–81 (2009).
 49. Sotoma, S. *et al.* In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors. *Sci. Adv.* **7**, eabd7888 (2021).
 50. Fujiwara, M. *et al.* Real-time nanodiamond thermometry probing in vivo thermogenic responses. *Sci. Adv.* **6**, eaba9636 (2020).
 51. Ding, Y., Ye, X. & Zhang, G. Microcalorimetric investigation on aggregation and dissolution of poly(N-isopropylacrylamide) chains in water. *Macromolecules* **38**, 904–908 (2005).

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました、大阪大学蛋白質研究所 蛋白質ナノ科学研究室の原田慶恵 教授に心より厚く御礼申し上げます。

日頃の実験や考察に関して丁寧なご指導、ご助言を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 生体分析化学教室の岡部弘基助教に心より感謝申し上げます。

本研究を通じて多くのご助言、ご協力を頂きました大阪大学蛋白質研究所 蛋白質ナノ科学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

細胞固定及び免疫染色実験における材料の提供やマウス初代培養細胞の摘出等の実験指導とともに、貴重なご指導、ご助言を賜りました産業技術総合研究所 関西センター バイオメディカル研究部門 研究グループ長の清末 和之先生に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、日頃から心の支えになってくださった家族と友人に心から感謝いたします。

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻
蛋白質ナノ科学研究室
2024 年 1 月
中馬 俊祐