

神経成長因子存在下で神経突起形成が見られない PC12m3 細胞における低周波振動音刺激による神経突起の誘導

小池 好久^{*1} 平上 二九三^{*2} 加納 良男^{*3}

*1 県立広島大学保健福祉学部作業療法学科

*2 吉備国際大学保健科学部理学療法学科

*3 吉備国際大学保健科学部作業療法学科

2007年 9月12日受付

2007年12月26日受理

抄 録

薬剤に高い感受性を示す PC12m3 細胞は、ニューロンモデル細胞である PC12 細胞の変異細胞である。今回の研究において、NGF 存在下のこの PC12m3 細胞に各々アンプレションレベル 5 の 10 ~ 20,000Hz の振動音刺激を 30 分間与えた。その結果、10Hz, 200 ~ 20,000Hz 間の振動音刺激では、神経突起の成長効果はほとんど得られなかったのに対して、20 ~ 150Hz 間の振動音刺激においては高い神経様突起成長を促した。コントロール群に対する神経突起成長比率は、40Hz の刺激で最も高くなり、コントロール比で約 3 倍の神経突起成長を促した。さらに、我々の実験では、直接振動刺激と音波刺激の双方で神経突起を誘導した。最も効果の高かった直接振動刺激と音波刺激での周波数は、各々 40Hz と 200Hz であった。どうして周波数の不一致が生じたのかの原因はよくわからない。しかしながら、40Hz 振動刺激の結果は、振動音響療法効果の中心領域である 20 ~ 80Hz の振動刺激帯に一致している。

キーワード：低周波直接振動刺激・低周波音波刺激・振動音響療法・PC12m3 細胞

はじめに

PC12細胞はGreenら^{1,2)}に、よってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有するニューロンモデル細胞である。正常なPC12細胞に神経成長因子(nerve growth factor; NGF)を作用させると、MAPK(mitogen-activated protein kinase; 分裂促進物質活性化タンパクキナーゼ)が持続して活性化し、その結果細胞分化と神経様突起の成長が誘導される³⁾。PC12細胞はこのような特性から、それまで死後培養脳でのみでしか知りえることが出来なかった神経細胞についての研究に、飛躍的な進歩をもたらすこととなった。そのため世界中の研究室でPC12細胞が培養されるようになってきたが、このPC12細胞はしばしば自然に突然変異を引き起こし^{4,5)}、その突然変異のPC12細胞も、細胞のいろいろな働きを研究するために使用されてきた。

今回著者が研究に使用したPC12m3細胞もこのような突然変異PC12細胞の一種である。このPC12m3細胞はNGF刺激によって正常な持続したMAPK(ERK)活性を示すにもかかわらず神経突起の形成がほとんど生じないが、NGFと同時にcAMP・カルシウムノホア・FK506(免疫抑制薬)などの薬剤を投与すると、高い神経突起の形成を生じるという特性を持つ^{6,7)}。

今回の研究では、音楽の中で、その人にとっての価値・呈示時の状況によって反応の傾向が異なる楽曲を排除し、純粋な音色(timbra)として感覚される正弦波の音波に着目した。この音波の主要な二つの変数はヘルツ(Hz)と振幅(amplitude)である。今回、振幅を一定にし、PC12m3細胞において、もう一つの変数であるヘルツの変化が神経突起成長にどのような影響を与えるかを直接振動刺激と音波刺激との比較、単周波数振動音刺激と规律的複合周波数振動音刺激との比較の2通りの実験を行った。その結果、PC12m3細胞において40Hzの単低周波直接振動刺激が神経突起成長の誘導を持つとも大きく誘導していることが分かった。また、この40Hzの単低周波直接振動刺激がp38MAPKとその下流の転写因子CREB[CRE-binding protein: CRE(cyclic AMP response element; 環状AMP応答因子)の結合タンパク]を活性させたことより、単低周波直接振動刺激がp38MAPKとCREBを活性させ神経突起成長を誘導するメカニズムがあることが示唆された。

そしてこの低周波数帯の振動刺激効果は、Skill⁷⁾により提唱された、刺激としての音(振動音)の生理的効果に着目した、音楽療法の新しい分野である振動音響療法(Vibro Acoustic Therapy)の振動音響の最も効果的な周波数帯域40~80Hzにあてはまる。さらに、小松ら⁸⁾の開発した体感音響装置(ボディソニック)による受容的音楽療法への応用は、広い臨床分野での治療効果や癒しの効果の報告がなされているが、この

装置に組み込まれているトランスデューサーは、20~50Hzの低周波数帯のみを振動させる装置である。今回の40Hzの振動刺激がPC12m3細胞において、高い神経突起成長を促したことから、Skillや小松らの振動音響における重要な低周波数帯の報告いづれにも、40Hzが含まれているという事実は、偶然ではなく、重要な意味を持つと考えられる。

方法

1. 細胞の培養

実験に使用したPC12m3細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有するPC12細胞(米国Rockvill, MEのAmerican type culture collectionより購入)の変異体細胞であり、Kano Y^{6,7)}らによって樹立されたものを使用。

PC12m3細胞は、0.35%のグルコースを含むDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)に10%馬血清と5%牛胎児血清を加え、さらに100 μg/mlのカナマイシンを加えた培地を用いて継代した。すべての細胞は、インキュベーター(炭酸ガス培養器)の中で、37℃に設定し5%のCO₂含有の状態において培養した。また、細胞は常時マイコプラズマ感染の有無をHoechst 33258で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行った。

2. 振動機と計測器

低周波音產生には、KENWOOD 204D(KENWOOD社、東京、日本)を使用し、周波数測定にはAD-5182マルチ・ファンクション・カウンター(A&D社、東京、日本)を用いた。

3. 神経突起形成率の決定

25cm²のフラスコにPC12m3細胞を約100万個時き、NGFを1 μl添加した後に実験群には振動刺激を与え、インキュベーション7日後に約500万~700万個に増殖・分化した各実験群で3個ずつのフラスコより、サンプルとして100~200個の間で細胞数を決定し、それら各々の細胞にある0~1個の突起の数を計測し、細胞数で割り、その三つの平均値を突起形成率とした。また、細胞の持つ神経突起の決定は、Morookaら¹⁰⁾にならう、細胞の直径の1.5倍以上の長さのものとした。

4. p38MAPK・CREBの検出

活性化したp38MAPK・CREBの検出は、Yao RやSakai T^{11,12)}らのウエスタンブロッティングの方法を用いて行った。

5. 振動音刺激と音波刺激の決定

KENWOOD 204Dにて産生された低周波音は、マルチ・ファンクション・カウンターにて周波数を決定し、上向きに固定され上面には厚さ 0.05mm のビニールを引き伸ばして張られたスピーカーにて振動刺激を産生した。そのビニール上に直接フラスコを置いたものを直接振動音刺激とし、このビニールを張ったスピーカーより 12cm 上方に来るように設定した 1cm の針金で作られたスタンドに、太さ 0.3mm の針金を張り、その針金三点で支持されたフラスコに与える刺激を音波刺激とした。

6. 単周波数振動音刺激と规律的複合周波数振動音刺激の比較

PC12m3 細胞において、最も神経突起成長率の高い効果をもたらした 40Hz 短周波振動音刺激と、±1Hz/1 秒の规律的周波数増減の 20 ~ 50Hz、10 ~ 100Hz 間の神経突起成長率の対比を行った。

7. データ分析

結果は one-way ANOVA (analysis of variance) を用い、コントロールとの有意差判定は、Dunnett's test 用いた。また総当り分析には、Student-Newman-Keuls (SNK) test を用いた。

結果

1. 振動音による PC12 細胞の神経突起の誘導

PC12m3 細胞に、10 ~ 20,000Hz の振動刺激を与え、振動音刺激に対する感受性をテストした。顕微鏡写真の図 1 は NGF を加えたのみの PC12m3 細胞と、NGF 存在下の KENWOOD 204D のアンプレーションレベル 5 強度で 30 分のそれぞれ 40Hz、200Hz、

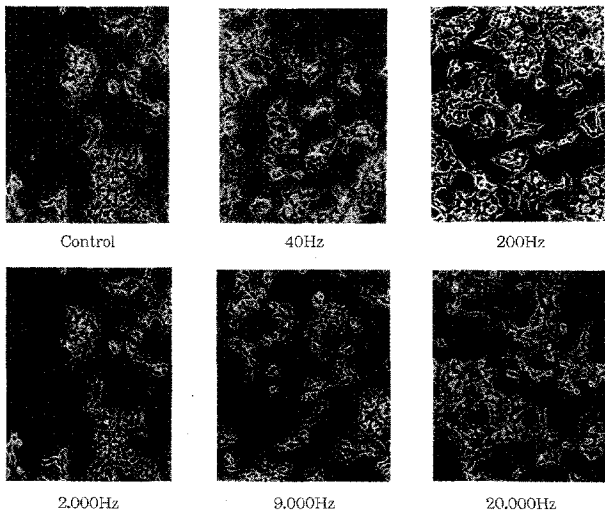


図1 直接振動刺激による PC12m3 細胞の神経突起形成の促進。コントロールおよび、40Hz、200Hz、2,000Hz、9,000Hz、20,000Hz の振動刺激を与えたものを 1 週間培養し、位相差顕微鏡で写真撮影を行った。(×200)

2,000Hz、9,000Hz、20,000Hz の振動刺激を与えた PC12m3 細胞の写真である。NGF 存在下で 40Hz の振動刺激を与えた PC12m3 細胞の神経突起成長率は、NGF を加えただけの PC12m3 細胞の神経突起成長率よりもはるかに高い神経突起成長率を見た。しかしながら、10Hz と 200Hz ~ 20,000Hz での振動刺激は、PC12m3 細胞においてはわずかな神経突起成長しか引き出せなかった。

PC12m3 細胞において、神経突起形成にもっとも適した振動刺激時間は 30 分で (図 2-1)、必要な振動の強さは、KENWOOD 204D のアンプレーションレベル 2 以上であった (図 2-2)。そのため、今回の研究

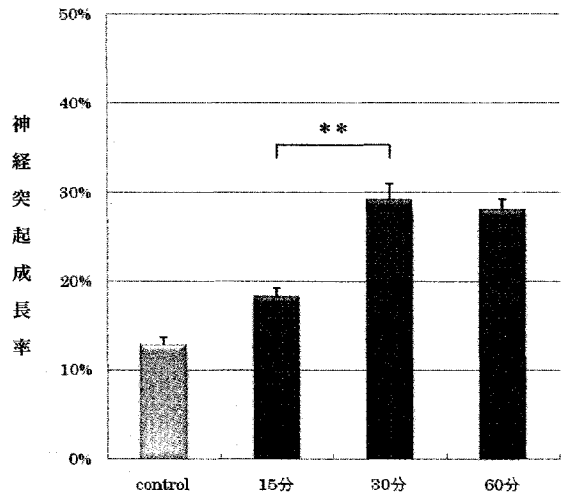


図2-1 振動刺激時間の変化における PC12m3 細胞の神経突起形成率の変化

PC12 m 3 細胞に 40Hz 振動刺激を 0 分・15 分・30 分・60 分与えた後に 1 週間培養後位相差顕微鏡で写真撮影を行い、神経突起形成率を調べた。15 分刺激と 30 分刺激では P < 0.01 で有意に差が生じた。

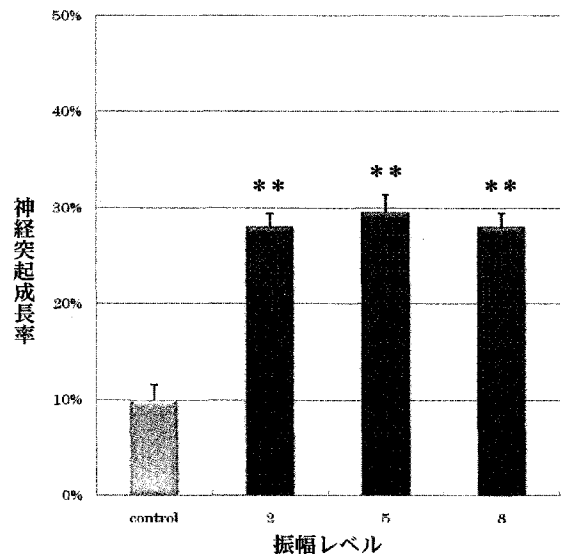


図2-2 振幅レベルの変化における PC12m3 細胞の神経突起形成率の変化

PC12m3 細胞は 40Hz 振動刺激を振幅レベル 0・2・5・8 と変化させて与えられ、一週間培養後位相差顕微鏡で写真撮影を行い、神経突起数を計測した。Control に対し、振幅レベル 2.5.8 ではともに P < 0.01 で有意に差が生じた。

では、NGF 存在下の PC12m3 細胞に、振動刺激時間 30 分・アンプレションレベル 5 という振動刺激を 10 ~ 20,000Hz までの範囲で当てて、神経突起形成率をみた (図 3)。その結果、20 ~ 150Hz までの振動刺激では神経突起成長率を高めた。また、40Hz での神経突起形成率が一番高く、NGF のみの添加のコントロール群に比し、約三倍強の神経突起成長率を見た。直接振動刺激と、音波刺激の比較においては、直接

振動刺激がもたらす神経突起成長の度合いは、音波刺激のそれよりもより高く、音波刺激よりもより低周波でおこなうことがわかり (図 4)、さらに 40Hz による単周波数振動刺激と 20 ~ 50Hz と 10 ~ 100Hz の律動的複合周波数振動刺激では、40Hz による単周波数振動刺激が 20 ~ 50Hz と 10 ~ 100Hz 複合周波数振動刺激より有意に神経突起成長が高く、20 ~ 50Hz と 10 ~ 100Hz 複合周波数振動刺激では有意差はなかった (図 5)。こ

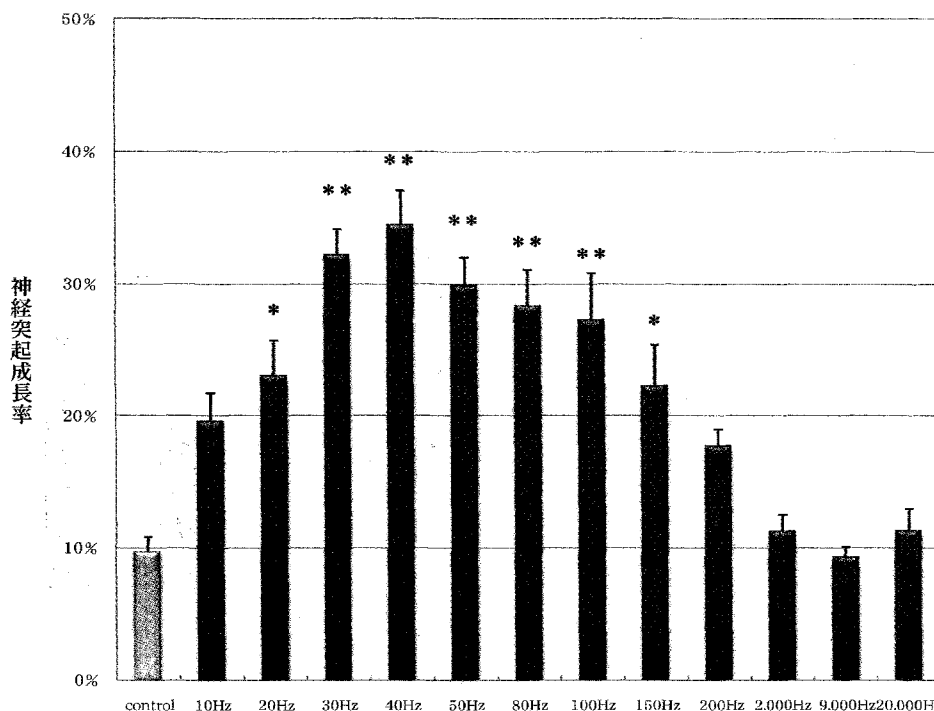


図3 PC12m3 細胞に対し振幅レベル 5・刺激時間 30 分で各々 10 ~ 20,000Hz の振動刺激を与えた後の神経突起成長率。10Hz と 150Hz では $p < 0.05$ でコントロールに対し有意に差が生じた。また、30Hz~100Hz では $p < 0.01$ でコントロールに対し有意に差が生じた。

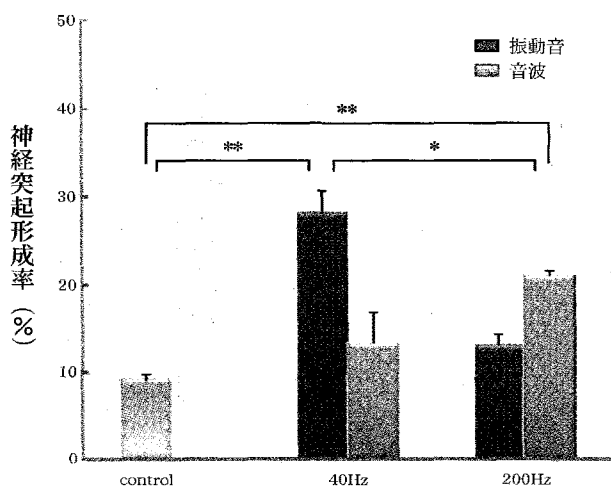


図4 PC12m3 細胞における振動音と音波による神経細胞突起誘導頻度

40Hz 振動音刺激と 200Hz 音波はコントロールに比して神経突起成長の頻度は有意差 $P < 0.01$ であった。また 40Hz 振動音刺激は 200Hz 音波に比して神経突起成長の頻度は有意差 $P < 0.05$ であった。

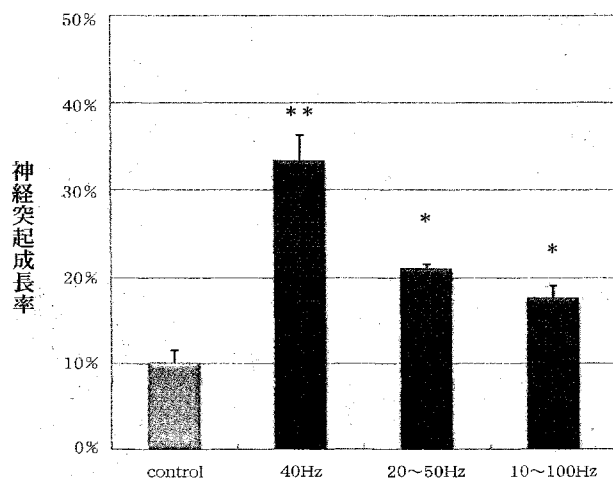


図5 単周波数振動刺激と複合周波数振動刺激による神経突起誘導率の促進

40Hz の単周波数振動刺激の神経突起誘導率は、コントロールに比べ約 3 倍である。コントロールに比べ単周波数振動刺激は $P < 0.01$ で有意差があり、複合振動刺激は $P < 0.05$ で有意に差が生じた。

これらの結果を統合すると、低周波の単周波数直接振動音刺激（特に40Hz）が、最もPC12m3細胞の神経突起成長率を高めることがわかった。

2. PC12m3細胞における、40Hz振動刺激でのp38MAPKとCREBの活性

p38MAPKの活性化はPC12m3細胞のニューロンの分化を促す重要な役割を担っている事がわかっており^{6,7)}、今回の研究では、低周波振動刺激によるp38MAPKの活性の影響の結果、PC12m3細胞の神経突起成長が誘導されるのかどうかの検討を行った。さらに低周波振動刺激によるp38MAPKの活性が下流の転写因子CREBの活性を誘導するのかどうかの検討も行った。PC12m3細胞に40Hzの低周波直接振動刺激を30分間与え、コントロールと共にそれぞれ、免疫ブロッティング法にて、p38MAPK・CREBの活性化をみた(図6)。結果は、40Hz直接振動刺激では、p38MAPKおよびCREBの高い活性を示したが、コントロールではp38MAPKおよびCREBの活性は高められなかった。また、PC12m3細胞にp38MAPKの阻害剤SB203580を10 μ l添加し、40Hzの直接振動音を30分与えても、神経突起の誘導はほとんど起こらなかった(図7)。これらのことよりPC12m3細胞においては、低周波直接振動刺激により、神経突起成長が促されるp38MAPK・CREBシグナル伝達経路があることが示唆された。

考察

哺乳動物細胞は少なくともERK (extracellular signal-regulated kinase)・JNK (c-Jun N-terminal kinase)・p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase)の3つ

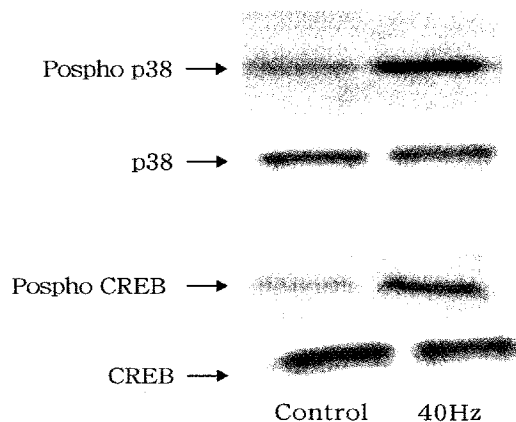


図6 PC12m3細胞における40Hz振動刺激によるp38MAPKとCREBの活性

PC12m3細胞に、NGF存在下、無血清でコントロール以外に振動刺激を与えた。細胞の溶解およびタンパクの抽出は、p38MAPKおよびCREB特異抗体によるウエスタンブロット法で行い、p38MAPKおよびCREBの検出を行った。

のMAPK経路を持っている。ERK経路は細胞の分化の調節に重要で、JNK経路は細胞のアポトーシスの調節に関与している。しかしながらp38MAPKはアポトーシスに働くという報告と神経突起誘導に働くというまったく異なった報告があり、現在p38MAPK経路の明確なシステムは明らかにされていない。

そのp38MAPKは、サイトカイン (cytokine ; ホルモン様低分子タンパクの総称。免疫反応の強さと期間を調節し、細胞同士の情報交換を媒介する。) やストレスに対し応答し、細胞のコントロールをするカスケードに関与しているとの報告がある¹³⁻¹⁵⁾。またRaingeaud J¹⁶⁾らは、p38MAPKは、浸透性のショックや、炎症性のサイトカイン・UVライト・成長因子などを含めた様々な細胞のストレスによって活性化されると報告している。今回、PC12m3細胞の実験において、40Hzの低周波振動刺激がp38MAPKを活性化させ、NGFのみ添加したコントロールに対して、約3倍の神経突起成長率を示した。しかしながら、p38MAPKの抑制剤SB203580を10 μ l添加し、40Hzの振動音刺激を与えても、神経突起の誘導はほとんど起こらなかった。PC12細胞を用いたMorooka T¹⁰⁾たちの報告によれば、PC12細胞においてp38MAPKがニューロンの成長円錐の保持や、神経突起成長、細胞の分離作用の調節・生存に関与していることを報告している。これらのことより、PC12m3細胞においては、低周波振動音刺激によりp38MAPKの活性が促され、神経突起形成につながったことがうかがわれた。さらに、この低周波振動刺激によるp38MAPKの活性が、下流にあるCREBの活性を高めている。このCREBは転写因子で、その働きは、細胞外の刺激に対する細胞の様々なシグナル伝達経路が活性を下流のCREBが仲介することにより、細胞の増殖や分化の応答を適応させている¹⁷⁾。さらに、Shaywitz A.Jら¹⁸⁾の報告によれば、p38MAPKはCREBの結合に重要な役割を果たすことが報告されている。これらを総合すると、PC12m3細胞

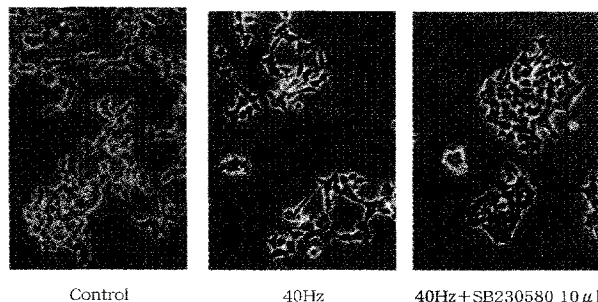


図7 直接振動刺激によるPC12m3細胞の神経突起形成の抑制

コントロールおよび、40Hzに40Hzの振動音を30分与えたもの、p38MAPKの抑制剤SB203580を10 μ l添加し、40Hzの振動音を30分与えたものを1週間培養し、位相差顕微鏡で写真撮影を行った。(×200)

胞では、40Hzの単低周波数直接振動刺激がp38MAPKを活性化させ、さらにその下流にあるCREBを活性化させるという、p38MAPK・CREBシグナル伝達経路系で分化(神経突起形成)働くことが示唆された。その経路としては、振動刺激音により細胞膜内にあるスフィンゴミエリナーゼ(Sphingomyelinase)がスフィンゴミエリン(Sphingomyelin)を加水分解し、セラミド(Ceramide)を遊離させることにより、MAPKシグナリング経路をリン酸化させる^{19, 20)}。p38MAPKシグナリング経路は分化に働き^{21, 22)}、JNK経路はアポトーシスを誘導する²⁰⁾という経路が考えられる(図8)。臨床場面において様々な疾病に対する治療効果があ

ることが報告されている、Skillにより提唱された振動音響療法の最も効果的な周波数帯域は40~80Hzにある。また、日本において広い臨床分野での治療効果や癒しの効果の報告がなされている小松らの開発した体感音響装置による受容的音楽療法の装置に組み込まれているトランスデューサーは、20~50Hzの周波数帯のみを振動させる装置である。このように、振動音響療法では、20~80Hzの低周波数領域が最も効果的な領域であり、今回の我々の研究においても、40Hzの単周波数振動音刺激がPC12m3細胞において最も高い神経突起形成率を見ている。これらの振動周波数の一致は、大きな意味があると考えられる。

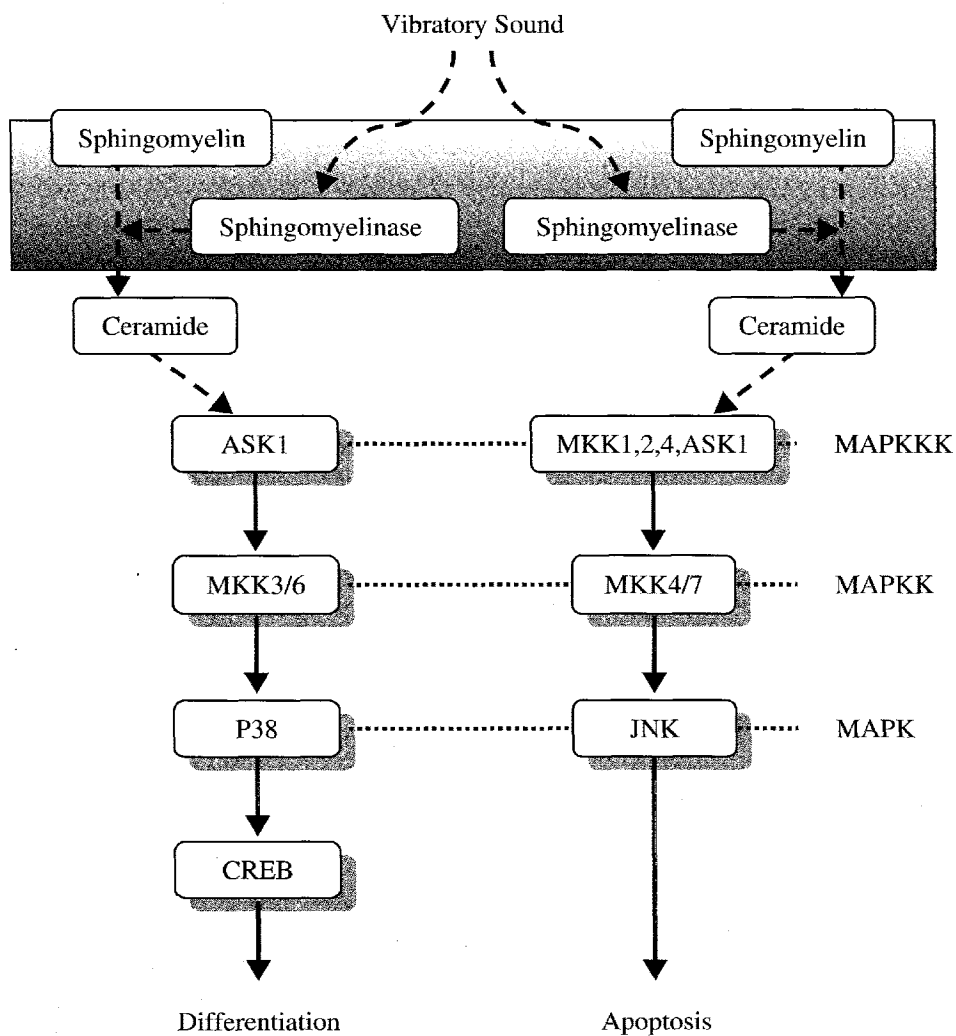


図8 振動刺激誘導シグナル伝達経路の想定モデル概念図

振動刺激音により細胞膜内にあるスフィンゴミエリナーゼ(Sphingomyelinase)がスフィンゴミエリン(Sphingomyelin)を加水分解し、セラミド(Ceramide)を遊離させることにより、MAPKシグナリング経路をリン酸化させると考えられる。p38MAPKシグナリング経路は分化に働き、JNK経路はアポトーシスを誘導すると考えられる。

文献

- 1) Greene, L.A. : A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res.*, 133 : 350-353, 1997
- 2) Greene, L.A. Tischler, A.S : PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell Neurobiol.*, 3 : 373-414, 1982
- 3) Erhardt, P., Trappmair, J., et al. : Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 5524-5530, 1995
- 4) Hatanaka, H. : Nerve growth factor-mediated stimulation of tyrosine hydroxylase activity in a clonal rat pheochromocytoma cell line. *Brain Res.*, 222 : 225-233, 1981
- 5) Teng, K.K., Georgieff, I.S., et al. : Characterization of a PC12 cell sub-clone (PC12-C41) with enhanced neurite outgrowth capacity. *J. Cell Science*, 106 : 611-626, 1993
- 6) Kano, Y., Hiragami, F., et al. : Immunosuppressant FK506 induces sustained activation of MAP kinase and promotes neurite outgrowth in PC12 mutant cells incapable of differentiating. *Cell Struct. Funct.*, 27 : 393-398, 2002
- 7) Kano, Y., Nohno, T., et al. : Immunosuppressant FK506 induces neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-prompted neuritegenesis via a novel MAP kinase signaling pathway. *Neurochem Res.*, 27 : 1647-1653, 2002
- 8) Skill, O. : Vibroacoustic therapy. *Music Therapy*, 8 : 61-77, 1989
- 9) 小松明 : 体感音響振動の効果メカニズム試論ーボディーソニックによる音楽療法の効果はなぜおこるのか. *日本バイオミュージック学会誌*, 7 : 28-36, 1992
- 10) Morooka, T. and Nisida, E. : Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 273 : 24285-24288, 1998
- 11) Yao, R. and Osada, H. : Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by γ -latam-related compounds via Ras-MAP kinase 16 signaling pathway independent mechanism. *Exp. Cell*, 234 : 233-239, 1997
- 12) Sakai, T., Furuyama, T., et al. : Mouse semaphorin H induces PC12 cell neurite outgrowth activating Ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca^{2+} influx. *J. Biol. Chem.*, 274 : 29666-29671, 1999
- 13) Han, J., Lee, J.D., et al. : A map kinase targeted by endotoxin and hyper-osmolarity in mammalian cells. *Science*, 265 : 808-811, 1994
- 14) Lee, J. C., Laydon, J. T., et al. : A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372 : 739-746, 1994
- 15) Freshney, N. W., Rawlinson, L., et al. : Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, 78 : 1039-1049, 1994
- 16) Raingeaud, J., Gupta, S., et al. : Pro-inflammatory cytokins and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 270 : 7420-7426, 1995
- 17) Zhou, J., Yao, G., et al. : CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells dependent on extra- and intracellular Ca^{2+} but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK. *BBRC*, 296 : 1013-1018, 2002
- 18) Shaywitz, A. J. and Greenberg, M. E. : CREB : A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signal. *Annu. Rev. Biochem.*, 68 : 821-861, 1999
- 19) Chung, H.S., Park, S.R., et al. : Role of sphingomyelin-MAPKs pathway in heat-induced apoptosis. *Exp. Mol. Med.*, 35 : 180-188, 2003
- 20) Kondo, T., Matuda, T., et al. : Role of c-jun expression increased by heat shock-and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 275 : 7668-7676, 2000.
- 21) Hiragami, F., Akiyama, J., et al. : Heat-shock-induced three-dimensional-like proliferation of mouse fibroblasts mediated by hydroxy-apatite. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 47 : 49-57, 2007
- 22) Kano, Y., Nohno, K., et al. : Osmotic shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB. *Brain Res.*, 1154 : 1-7, 2007

Vibratory sound induces neurite outgrowth in PC12m3 cells in which nerve growth factor-induced neurite outgrowth is impaired

Yoshiko ISHIDA*¹ Fukumi HIRAGAMI*² Yoshio KANO*³

*1 Department of Occupational Therapy, Faculty of Health and Welfare, Prefectural University of Hiroshima

*2 Department of Physical Therapy, School of Health Science, Kibi International University

*3 Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kibi International University

Received 12 September 2007

Accepted 26 December 2007

Abstract

A drug-hypersensitive PC12 mutant cell line (PC12m3) was obtained during continuous culturing of neural PC12 cells. In this study, PC12m3 cells were exposed to vibratory sound stimuli of frequencies ranging from 10 to 20,000Hz for 30 minutes at intensity 5, alone with the addition of NGF. The results showed that vibratory sounds of 20-150Hz induced enhancement of neurite outgrowth, whereas vibratory sound 10Hz and 150Hz to 20,000Hz had little effect on neurite outgrowth. The frequency of neurite outgrowth induced by 40-Hz sound stimuli was approximately 3-fold greater than that induced by NGF alone. Furthermore, our results showed that both vibratory sounds and sound waves, 40Hz and 200Hz, respectively, were the most effective. The reason for the discrepancy in frequency is not clear. However, the effect of 40-Hz vibratory sounds is consistent with the effect of the Vibratory Acoustic Therapy which mainly uses vibratory sounds between 40-Hz and 80-Hz.

Key words : low-frequency vibratory sound, low-frequency wave sound vibroacoustic therapy, PC12m3 cell