HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Extracellular Laminins distinctively regulate phenotypic expression of PC-12 neuronal cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西浦, まい
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16448号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94969
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mai_Nishiura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏 名 西 浦 ま い

学 位 論 文 題 名

Extracellular Laminins distinctively regulate phenotypic expression of PC-12 neuronal cells（細胞外ラミニンはPC-12神経細胞の表現型発現を特有に制御する）

キーワード（５つ）細胞外マトリックス，ラミニン，分化誘導，副腎褐色細胞，神経

細胞は、周囲の細胞外マトリックス（ECM）との相互作用を通して、増殖、分化、細胞死などの活性を、様々な成長因子受容体から生じるシグナルと連動して調節している。ラミニンはECMの主要成分であり、5本のα鎖、3本のβ鎖、3本のγ鎖からなる三量体タンパク質複合体である。各ラミニンアイソフォームは組織特異的、発生段階特異的に発現し、細胞表面受容体としてインテグリンサブタイプと結合する。 その中でもラミニンα5β1γ1（ラミニン-511）は多能性胚エピブラストの基底膜の構成成分であり、ヒト胚性幹細胞（hESC）の未分化能を維持し、分化を制御するための培養基材として使用されてきたほか、近年では神経細胞の生存と発達のためのシグナル伝達経路を制御していることが解明され、神経再生療法の開発にも応用されている。ラミニン α2β2γ1（ラミニン-221）は心筋に豊富に発現しており、hESC の心筋細胞系への分化促進、心筋の再生治療、iPS 細胞から脳微小血管内皮様細胞の誘導などに応用されている。このように ECM の分子組成を操作することによって幹細胞の運命と機能を制御することは、再生医療における魅力的なアプローチとなっている。

褐色細胞腫は、副腎髄質のクロム親和性細胞に由来する稀な腫瘍である。罹患患者における交感神経刺激は、褐色細胞腫由来のカテコールアミンの過剰分泌を生じ、急激な血圧上昇や頻脈を引き起こすため、歯科治療を含む外科治療時の循環管理に支障をきたす。しかし、その分子病態に基づく治療法は十分に確立されていない。ラットの副腎髄質の褐色細胞腫から樹立されたPC-12細胞は、神経成長因子（NGF）存在下で、感覚、自律神経ニュ

ーロンの様々な神経表現型を発現することが知られており、神経細胞分化や神経機能の解析、さらにはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患のモデルとして広く用いられている。

本研究では、褐色細胞腫の分化誘導療法に基づく新たな薬物療法の開発を目的として、培養ディッシュ底の非コーティング（対照群)、ラミニン-511 コーティング（ラミニン-511 群)、ラミニン-221 コーティング（ラミニン-221 群）の３条件で PC-12 細胞を培養し、神経細胞表現型を比較した。PC-12 細胞は 15000 細胞／1cm^2 の一定密度で播種、NGF 含有神経培地で７日間培養し、神経突起の伸長により神経細胞に分化していることを確認した。

細胞増殖アッセイと位相差顕微鏡観察の結果、細胞数に有意差は認められなかったが、細胞形態には明確な違いが認められた。ラミニン-511 群の PC-12 細胞は、非典型的な丸く肥大した細胞体を示したが、対照群およびラミニン-221 群の細胞は、樹状突起が伸長した小さな細胞体を持つ典型的な神経細胞形状を示した。細胞形状をさらに比較するために、免疫細胞染色による観察を行った。典型的な有糸分裂後の神経細胞マーカーである NeuN は、いずれの条件でもすべての細胞で核に発現していた。アクチンとチューブリンの細胞内局在は、細胞の形状と樹状突起の伸長パターンの差異を表していた。これらの観察から、ラミニン-511 コーティング条件下で培養した PC-12 細胞は神経細胞表現型ではなく分泌細胞表現型を示し、非典型的な細胞形態であることが示された。このことから、腫瘍化により脱分化状態にある PC-12 細胞を、ラミニン-511 が細胞形態レベルで本来の副腎髄質のクロム親和性細胞へ分化誘導している可能性が考えられた。

次に、各培養条件での PC-12 細胞の表現型を遺伝子転写レベルで比較するために、定量的 PCR 解析を行った。クロム親和性細胞の機能的マーカー遺伝子のうち、血管作動性腸管ペプチドをコードする *Vip* やインターロイキン-6 をコードする *Il6* の発現は、対照群やラミニン-221 群に比べ、ラミニン-511 群で有意に上昇した。早期神経細胞系譜マーカーをコードする *Sox2* はラミニン-511 群と 221 群で有意に低下しており、PC-12 細胞の脱分化状態が抑制されていることが示唆された。ペプチド性神経伝達物質をコードする感覚（侵害受容性）神経マーカーの *Calca* レベルはラミニン-511 群で有意に低下した。これらの結果から、ラミニン-511 は PC-12 細胞の脱分化表現型を抑制し、クロム親和性細胞の表現型を促進することが示唆された。

対照群とラミニン-511 群での PC-12 細胞の表現型の変化をさらに調べるために、クロム親和性細胞に発現するタンパク質に対する抗体を用いて免疫細胞染色を行った。カテコールアミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素（TH)、シナプス前小胞輸送に重要な役割を果たすシナプトフィジンの細胞内分布は、対照群の PC-12 細胞では細胞周辺と樹状突起に発現していたのに対し、ラミニン-511 群では細胞質と核周辺に発現と局在が変化した。一方 VIP は、対照群では一部の細胞の樹状突起にまばらに観察されたが、ラミニン-511 群の細胞質では、VIP 発現小胞および細胞周辺での局在が観察された。カテコラミンと共分泌される酸性糖タンパク質クロモグラニン A も同様に、対照群では主に軸索末端に発現して

いるのに対して、ラミニン-511 群では、これらの発現は細胞質の周辺に認められた。これらの観察から、コントロール群では神経軸索分泌の形質が観察されたのに対し、ラミニン-511 群では副腎髄質のクロム親和性細胞のように内分泌細胞様の形質に変化したことが示唆された。

また、7 週齢の雌の SD ラットの副腎の免疫組織化学染色の結果、NeuN/Rbfox3 はラットの副腎髄質に特異的に発現しており、この観察から、NeuN/Rbfox3 の発現は内分泌細胞でも維持されていることが示された。

本研究により、PC-12 細胞に対するラミニン-511 および 211 サブタイプの異なる作用が明らかになった。ラミニン・インテグリン相互作用の特異性は、主にα鎖によって大きく規定されるが、3 つのラミニン鎖すべてがインテグリン結合を促進するために協調的に働くことが知られている。インテグリンサブタイプは、細胞骨格形成を制御する下流のシグナル伝達分子を主に共有しているため、シグナル伝達の振幅やクロストークがわずかに異なるだけで、異なる様々な細胞機能を発揮する可能性がある。

本研究では、ラミニン-511 をコーティングした条件下で、副腎髄質のクロム親和性細胞の表現型発現を特異的に刺激することが明らかになり、抗腫瘍効果が示唆された。 今回の知見は、褐色細胞腫の分化誘導療法に基づく新たな薬物療法の開発に貢献するものである。また、本研究は、ラミニンの異なるサブタイプが、神経サブタイプの表現系を異なる様式で調節することを示した。細胞外基質を調節することで、特定の神経サブタイプが誘導可能になれば、神経疾患治療薬の探索において新たな ex vivo での解析系を構築することが可能になるかも知れない。