



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Live cell imaging analyses of parathyroid hormone-mediated signaling in human neuronal cells
Author(s)	上野, 楓実
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16924号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16924
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99769
Type	doctoral thesis
File Information	Fumi_Ueno_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 上野 楓実

主査 教授 飯村 忠浩
審査担当者 副査 教授 佐藤 嘉晃
副査 教授 船橋 誠

学 位 論 文 題 名

Live cell imaging analyses of parathyroid hormone-mediated signaling in human neuronal cells

（ヒト神経細胞における副甲状腺ホルモンを介した
シグナル伝達の生細胞イメージング解析）

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

骨粗鬆症は骨量減少と骨微細構造の劣化により骨折リスクが増加する疾患である。骨粗鬆症は、しばしば慢性腰背部痛を含む骨格痛を伴い、ADL および QOL を低下させる。テリパラチド (TPTD) はヒト副甲状腺ホルモン (PTH) 製剤であり、骨形成促進型の骨粗鬆症治療薬である。TPTD (PTH) には、骨量増加作用のみならず骨格痛を軽減する効果があることが臨床的にも基礎医学的にも報告されている。所属研究室の先行研究により、TPTD (PTH) は神経細胞にも作用することが報告されているが、その細胞内シグナル伝達機構については不明な点が多い。本研究では中枢神経系ニューロンの *in vitro* モデルとして広く用いられているヒト神経芽腫由来細胞株 SH-SY5Y 細胞を用いて、神経細胞におけるテリパラチドの特異的受容体である PTH1 型受容体 (PTH1R) のシグナル伝達機構の解明を目的とした。

ヒト神経細胞における PTH1R の発現を調べるため、SH-SY5Y 細胞に抗 PTH1R 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。SH-SY5Y 細胞は通常培地では円形の腫瘍様細胞の形態を示すが、レチノイン酸添加培地では神経突起を伸長し神経様細胞に分化する。免疫蛍光染色の結果、PTH1R は分化誘導前と比較して分化状態で発現が亢進していた。また、RT-qPCR 解析でも同様に、分化した神経細胞において *PTH1R* の遺伝子発現が上昇していた。これらの観察から、PTH1R は分化した神経細胞において機能していることが示唆された。

PTH1R とそのリガンドである TPTD (PTH) は、細胞表面で結合すると複合体として細胞質内に取り込まれることが知られている（内在化）。このことを確認するため、分化した SH-SY5Y 細胞を TPTD で 12 時間処理し、抗 PTH 抗体および抗 PTH1R 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。その結果、分化した SH-SY5Y 細胞において、投与された TPTD (PTH) は、その受容体である PTH1R とともに内在化されることを観察した。

PTH1R は GPCR 型の受容体であり、骨芽細胞系譜細胞では、PTH と結合することで、細胞内 cAMP レベルを増加させる Gs 経路と、細胞内 Ca^{2+} レベルを増加させる Gq 経路を活性化することが知られている。そこで、神経細胞に対する TPTD (PTH) 刺激が Gs 経路を活性化するかどうかを調べた。蛍光 cAMP

レポーターである Pink Flamingo を用いた生細胞イメージングを応用し、TPTD(PTH)処理した SH-SY5Y 細胞における細胞内 cAMP レベルの時空間的变化を解析した。この解析により、TPTD(PTH)が分化したヒト神経細胞において細胞内 cAMP を介したシグナル伝達を刺激することを観察した。また、TPTD(PTH)刺激が Gq 経路を活性化するかどうかを調べるため、蛍光 Ca^{2+} レポーターである GCaMP を用いた生細胞イメージングを応用し、同様に解析した。しかし、明らかな応答は認められなかった。これらの生細胞イメージング解析から得られた結果は、分化 SH-SY5Y 細胞における TPTD(PTH)シグナル伝達が Gs 経路に強く偏っていることを示唆した。このことをさらに確認するため、PTH-PTH1R-Gs を介したシグナル伝達による既知の初期応答遺伝子を RT-qPCR で解析した。その結果、TPTD(PTH)によって、いくつかの応答遺伝子の発現が亢進することを観察した。このことは、分化誘導された SH-SY5Y 細胞において TPTD(PTH)が Gs 結合偏向型シグナル伝達を刺激することを支持していた。

以上の結果より、TPTD(PTH)が主に Gs/cAMP 経路を活性化することが示された。この知見は、TPTD(PTH)の神経細胞への作用を解明するための基盤を提供した。

上記の論文内容及び関連事項について、以下の質疑応答がなされた。

1. Ca 生細胞イメージングにおいて、陽性対照として ATP を用いた理由について。
2. SH-SY5Y 細胞は、活動電位は発生するか。
3. SH-SY5Y 細胞では他にどんなイオンチャネルが動くか、既知の知見はあるか。
4. DRG ニューロンで PTH1R は発現しているのか。
5. TPTD 自体に抗神経炎症作用があるようだが、それによる疼痛抑制効果もあるか。
6. TPTD が DRG にも作用するとのことだが、どのようなメカニズムで疼痛を軽減するのか。
7. SH-SY5Y 細胞に TRPV1 は存在するか。
8. 完全に分化成熟した後の細胞でも TPTD は作用するのか。
9. SH-SY5Y の由来と性質について。
10. TPTD により cAMP のシグナルが主に活性化されていたが、その結果として、神経機能的な作用、分化系譜を変える作用、疼痛抑制に関与するなどの作用があったのか。
11. cAMP イメージングで、TPTD による作用が短時間であることの意味合いについて。
12. フォルスコリンと TPTD の相加効果について。
13. 本研究の今後の展望について。

これらの質問に対して、学位申請者から明解な説明と回答が得られた。本研究の内容から審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに相応しいと認めた。