



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_summary.pdf, 全文の要約



学位論文内容の要約

学位論文題目

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)

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 上野 楓実

骨粗鬆症は骨量減少と骨微細構造の劣化を特徴とし、骨折リスクの増加だけでなく、慢性腰背部痛を含む骨格痛を伴う。この骨格痛は骨折の有無にかかわらず発生し、サルコペニア、虚弱化、心血管機能の低下、認知機能低下などの二次的障害を通じて ADL および QOL を低下させる。骨格痛の慢性化には、エストロゲン欠乏下で活性化される破骨細胞、単球、マクロファージ由来の酸および炎症性サイトカインによる骨膜感覚神経系の持続的興奮に加え、脊髄におけるセロトニン受容体発現の減少に伴う下降性抑制系の活性化低下がかかわると考えられている。骨形成促進型の骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド（TPTD；ヒト副甲状腺ホルモン（PTH）の 1-34 断片）には、骨格痛軽減効果があることが臨床的にも基礎医学的にも確認されている。TPTD による腰背部痛改善は治療初期段階から観察され、その効果は治療中止後も持続することが報告されている。これらの知見は、TPTD が骨形成作用だけでなく神経活性作用も有することを示唆している。

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 PTH1R シグナル伝達の作用解明を目的とした。未分化状態およびレチノイン酸誘導分化状態における PTH1R 発現を評価し、PTH（TPTD）投与後の細胞内移行変化を解析した。生細胞イメージング法を活用し、cAMP および Ca^{2+} を介したシグナル応答と下流遺伝子発現の変化を時空間的に分析した。

ヒト神経細胞における PTH1R の発現を調べるため、まず未分化および分化状態の SH-SY5Y 細胞において抗 PTH1R 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。SH-SY5Y 細胞は、播種後 1 日間（1 日目：未分化状態）維持され、その後分化培地中のレチノイン酸添加により 5 日間（6 日目：分化状態）神経細胞分化が誘導された。PTH1R シグナルは未分化状態と比較して分化状態で増強されているように観察され、PTH1R は分化よりも主に神経機能において役割を果たしていることが示唆された。また、抗 PTH1R 免疫蛍光染色による上記所見をさらに確認するため、分化開始 1 日目、3 日目、6 日目に RT-qPCR 解析を行い、分化神経細胞において PTH1R 発現が上昇していることを確認した。

次に、PTH1R とそのリガンド（PTH や PTHrP など）の複合体は、細胞表面で結合すると細胞質内に取り込まれることがよく知られているが、このことを確認するため、分化 SH-SY5Y 細胞を TPTD で 12 時間処理後、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 SH-SY5Y 細胞において、投与された PTH（TPTD）は、その受容体である PTH1R とともに内在化することを観察した。

PTH1R へリガンド刺激は、G タンパク質複合体と共役し、細胞内 cAMP の上昇（Gs 経路）および細胞内 Ca^{2+} の上昇（Gq 経路）を誘導することが知られている。しかしながら、神経細胞における PTH1R 刺激経路は不明であった。そこで、PTH（TPTD）刺激が Gs 経路を誘導するかどうかを調べるため、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活用し、PTH（TPTD）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、骨芽細胞系細胞で以前に報告されたように、PTH（TPTD）が分化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 刺激が Gq 経路を誘導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活用し、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 PTH（TPTD）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。6 日目の分化誘導された SH-SY5Y 細胞を TPTD および溶媒で 4 時間処理後、RT-qPCR を実施した。その結果、PTH（TPTD）刺激によって、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 PTH（TPTD）が Gs 結合偏向型シグナル伝達を刺激することを総合的に支持していた。

以上の結果より、PTH(TPTD)が主に Gs/cAMP/CREB 経路を刺激することが示され、PTH/PTH1R

シグナル伝達が神経機能に関与する可能性が示唆された。この知見は、PTH（TPTD）の神経活性効果を解明するための基礎を提供した。