

532 nm 低出力レーザーを用いた細胞増殖とニューロジェネシスに関する研究

A study of cell proliferation and neurogenesis by 532 nm low-power laser irradiation

12D5604

福崎 由美

指導教員 木暮 信一

SYNOPSIS

It has been reported that the low-power laser irradiation (LLI) can promote cell proliferation and survival. We designed two experiments in order to improve the mechanism and usability of 532 nm LLI. First, the γ -secretase inhibitor (GSI) has been shown to inhibit expression of amyloid beta (A β), but GSI also has a side effect of reducing cell survival. Thus we examined whether 532 nm LLI can rescue the GSI side effect or not. In the results, GSI application depressed cell proliferation as well as cell survival compared to control. GSI down-regulated A β but up-regulated p-PTEN and suppressed p-Akt. Application of 532 nm LLI in the presence of GSI significantly recovered the GSI-mediated effects, i.e., LLI could decrease elevated p-PTEN, while increased p-Akt expression with keeping A β suppression. The LLI effects had a dose-dependency. Second, since 532 nm LLI promoted activity of Akt, we examined effect of 532 nm LLI via Akt on neural stem/progenitor cells(NSPCs) in culture cells and adult mouse brain. In the result, LLI promoted proliferation of excitatory NSPCs and promoted differentiation of inhibitory NSPCs. In the adult mouse brain, LLI facilitated migration of inhibitory NSPCs from layer 1 to deep layer in the cortex.

1. 緒言

低出力レーザー照射 (以下、LLI:Low-power laser irradiation: LLI) の研究は、1968年 Mester らによる皮膚潰瘍への照射実験¹⁾から始まり、現在では皮膚の創傷治癒や疼痛緩和の非侵襲性治療に用いられ、一定の効果をj得ている²⁾。しかし、効果の最適条件に普遍性がなく、その作用メカニズムは未だ完全には解明されていない。

培養細胞に対する LLI は、皮膚細胞が最も多く検討されている。その効果は細胞種やレーザー波長によって効果が異なることが報告されている。たとえば、665 nm LLI と 675 nm LLI が線維芽細胞や内皮細胞の増殖を促進させ、810 nm LLI では線維芽細胞の増殖を抑制させるとの報告がある³⁾。中枢神経系培養細胞への照射では、ヒト由来脳腫瘍細胞 (U373MG 株) に対して 805 nm LLI が増殖を抑制することが示されている⁴⁾。脳に対する研究では、LLI が脳外傷による障害を抑制すると報告されている⁵⁾。そこでは、アポトーシスによる細胞死を抑制することで二次的障害を抑制していること、そして神経細胞が新生していることを示している。しかし、

神経幹/前駆細胞 (以下、NSPCs : Neural Stem/Progenitor Cells) の細胞増殖と細胞内メカニズムの検討は行われていない。

脳腫瘍細胞 Glioma はその病態と悪性度から、WHOによりグレードIからIVまで区別されている。グレードIは astrocytoma であり、アストロサイト様形態を示し細胞増殖率が低い。悪性度の最も高いグレードIVは Glioblastoma と呼ばれ、細胞増殖率が極めて高い。これらの WHO グレードの悪性度が高い細胞ほど膜タンパク質である Notch の発現が高いことが報告されている。正常細胞では Notch は NSPCs に高発現していることから、Glioblastoma は未分化度が高い脳腫瘍細胞であることが示唆されている。

所属する研究室の先行研究では、ヒト由来脳腫瘍細胞 Glioblastoma(A-172 株)に対し、808 nm LLI (近赤外光)は細胞周期を遅延させ⁶⁾、405 nm LLI (青紫色光)は細胞死を誘発させること⁷⁾が示されてきた。本研究では、532 nm LLI (緑色光) を用いて細胞増殖率および細胞内増殖関連タンパク質 Akt に対する影響を検討した。つづいて、Notch の活性を抑制する

γ -secretase inhibitor(GSI)との併用実験を試みた。GSIはNotchの活性を抑えることから、がん細胞の研究にも用いられてきたが、同様にアルツハイマーの原因物質であるアミロイドペプター(A β)の前駆体である amyloid precursor protein (APP)の活性にも関与することが知られている。つづいて、532 nm LLIのNSPCsへの検討をするため、マウス胎児からニューロスフィア法に基づいて初代培養を行った(*in vitro* 実験)。興奮性細胞が産生されるマウス胎生期(E)10.5の前脳(FB)、抑制性細胞が産生されるE14.5の基底核隆起(GE)、それらの細胞が混在しているE16.5の大脳皮質(Crx)からニューロスフィアを作成した。成体のNSPCsへ対する検討(*in vivo* 実験)には、軽度脳虚血の条件下で脳新皮質第一層のNSPCsが抑制性神経へ分化し深い層へ細胞遊走することが報告されていることから、532 nm LLIを頭蓋骨の上から照射した。

2. 方法

2-1. レーザー照射方法

レーザー照射には、ポータブル型半導体レーザー装置(SUWTECH, LDC-2500: Nd:YVO₄, CW, 532 nm)を用いた。パワーは60 mW、照射面積は $7.1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ 、単位面積当たりの照射パワーは 845 mW/cm^2 であった。培養細胞へのLLIは、37°C下でCulturePal CO₂ (Cosmobio)を使用し5%CO₂を保持した。

2-2. 細胞培養(A-172, NSPCs)

ヒト由来脳腫瘍細胞(Glioblastoma A-172: JCRB, #0228)は10% FBS-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)培地を使用した。継代は0.1% trypsin-PBSで分散し、播種した。GSI (calbiochem)はLLIの3時間前に最終濃度25 μM で添加した。

NSPCs培養はE10.5とE14.5、E16.5から単離培養した。培地はF12/DMEMに100 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin、30 nmol/ml Selenium、10 $\mu\text{g/ml}$ Heparin、25 $\mu\text{g/ml}$ Insulin、20ng/ml bFGFを添加した。浮遊細胞塊(neurosphere)を顕微鏡下で回収し、LLI実験に用いた。

2-3. 培養細胞増殖率の計測

A-172の細胞計測にはペトリ皿の底面にグリッドシールをはり、定点観察した。また、MTT:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromi-

de 比色分析法を使用した。NSPCsの細胞計測にはCell counting kit-8: CCK-8法(Dojindo)とDAPI染色とNeurosphereのサイズ計測を行った。

2-4. 培養細胞の免疫蛍光染色

細胞は4%PFA固定し、ブロッキング後4°Cオーバーナイトで一次抗体: Anti-pS⁴⁷³ Akt, anti-p-Pten Ser380/Thr382/383、APP/beta Amyloid NAB288(CST)を反応させた。翌日、二次抗体の反応後に封入した。蛍光顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)で撮影し、BZ-9000解析ソフトで輝度値を測定し、非照射群の値で基準化した。

2-5. 一時的軽度虚血モデルマウス

成体FVBマウス(P>60)はガス麻酔で沈静化させ、保温しながら両側の総頸動脈(common carotid artery: CCA)を解離し、絹糸で縛り10分間閉塞後再灌流した。傷口を縫合し、2%リドカインを塗布し覚醒するまで保温した。また、閉塞せず縫合したものを偽手術(sham control)マウスとした。10分間のCCA閉塞が軽度かの検討およびLLIの細胞死への影響の検討にはtriphenyltetrazolium chloride: TTC染色を用いた。

2-6. 脳切片の免疫蛍光染色

LLI直後に50 mg/kgで5-ethynyl-2'-deoxyuridine: EdUを腹腔注射し⁸⁾、4時間後と5日後にマウスを4%PFAで心臓還流固定し脳を取り出し、2時間後固定した。脳切片は冠状断面で50 μm にし、Ki67の抗原賦活化には80°C恒温水槽で30分間熱処理した。EdU染色はClick-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 imaging kits(life technologies)を使用した。マウス抗体のブロッキングにはM.O.M kit(Vector)を使用した。一次抗体:anti-GAD67, anti-Ki67は4°Cでオーバーナイトし、核染色にはHoechst 33342を使用した。

2-7. ウェスタンブロット

培養細胞または脳ブロックに溶解溶液(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% Triton X-100)とloading dyeを加えた。電気泳動とメンブレン転写後、BSAとDry milkでブロッキングし、4°Cオーバーナイトで一次抗体: anti-pAkt, anti-Akt, anti-GAPDH反応させた。HRP標識二次抗体反応後、化学発光させ検出した。pAktとAktの値はGAPDHで基準化した。

3. 結果 1:A-172 に対する LLI 効果

3-1. 細胞増殖率と Akt への影響

細胞増殖率は、定点撮影法に基づく細胞計数法と MTT 法によって算出した。LLI は A-172 の細胞増殖率を非照射コントロールに比べて有意に促進させた ($p < 0.05$ or $p < 0.01$)。その効果は照射時間に依存し、60 分間照射が最大の細胞増殖促進効果をもたらした。(Fig.1) 細胞の生存や増殖に関連する細胞内タンパク質である Akt は LLI により活性化が促進され、反対に Akt の調節タンパク質である PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome) の活性化は減少された。

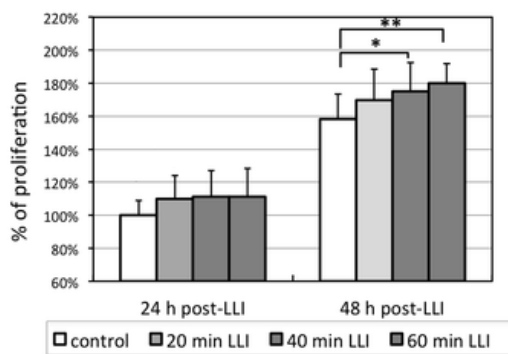


Fig. 1 : A-172 の照射から 24h, 48h 後の細胞増殖率

3-2. GSI との併用

GSI は APP からの A β 切断を阻害するが、同時に Notch の切断も阻害し Notch-Pten-Akt 経路を抑制してしまうことが細胞生存に関わる重篤な副作用を誘引している。LLI が Akt を活性化する効果がみられたことから、GSI 条件下でも Akt を活性化し副作用を抑制できるかどうかを検討した。非照射群、LLI 群、GSI 群、併用群(LLI+GSI)において、LLI から 24、48 時間後に細胞数計測を行った。GSI を添加すると、非照射群のコントロールよりも細胞増殖を抑制したが、GSI に加えて LLI を併用すると細胞増殖は再び促進され、24、48 時間後で有意差が得られた。24 時間後においてはコントロールとほぼ同じ増殖率にまで回復させた。また、GSI によって A β は減少したが、LLI がその抑制効果を打ち消す事はなかった。GSI は Pten を活性化させ Akt を抑制したが、LLI との併用は Pten の活性化を抑え Akt の活性化を促進させ副作用を軽減させた。(Fig.2)

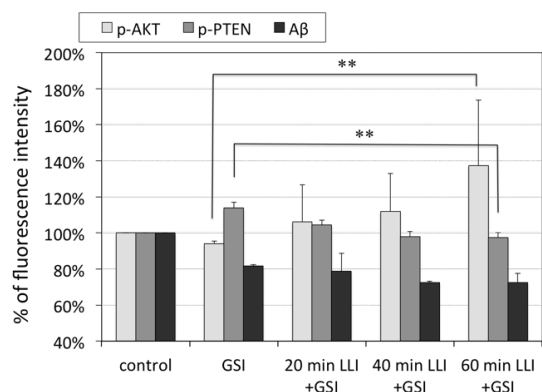


Fig. 2: GSI と LLI 併用時の細胞内タンパク質への効果

4. 結果 2: マウス神経幹細胞に対する LLI 効果

4-1. 初代培養 NSPCs

CCK-8 分析による細胞増殖率は、E10-前脳由来の興奮性 NSPCs は LLI によって有意に増殖が増加したが、E14-MGE 由来の抑制性 NSPCs では増殖率は非照射コントロールに比べ増加しなかった(Fig.3A)。E10-NSPCs は DAPI によるカウントと Neurosphere のサイズ測定による増殖率算出においても同様に LLI による増殖促進が示された。トランスメンブレンを用いた検討では E14.5 GE 由来の細胞は細胞遊走が促進していることが示された。ニューロスフィアを LLI 直後にウエスタンブロットで検討したところ Akt の発現が増加した。(Fig.3B)

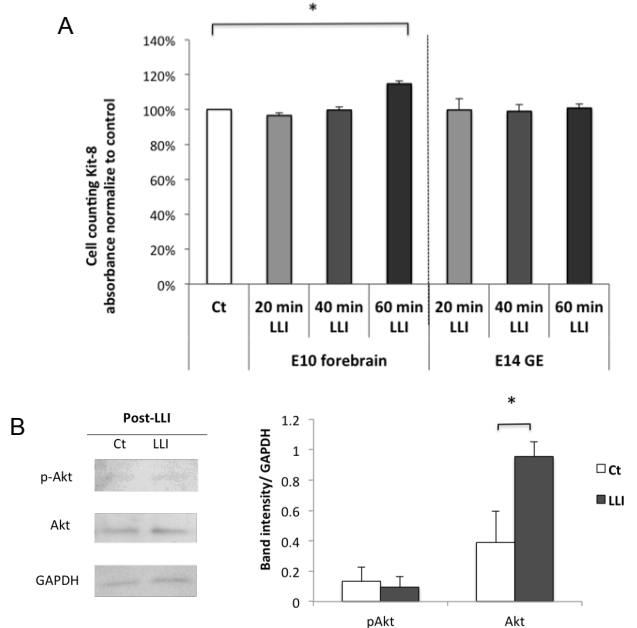


Fig. 3 : 培養細胞の NSPCs に対する LLI 効果

4-2. 成体マウス大脳新皮質の NSPCs

成体マウス(P>60)を CCA 閉塞による一時的軽度虚血にして1日回復させた。頭蓋骨を露出させ、LLIを非侵襲的に行った。照射部位は側頭葉の聴覚野とし、反対側脳半球を非照射コントロールとした。TTC染色による死細胞の検討では、虚血とLLIによる細胞障害はみられなかった。増殖細胞マーカーKi67と抑制性細胞マーカーGAD67およびS期マーカーEdUを用いた多重染色では、Ki67+ GAD67+ EdU+は大脳新皮質第一層のみに観察された。増殖期を逸脱したKi67- GAD67+ EdU+細胞はLLI照射がコントロールに比べてより深い層で多く観察された(KS-test, $p < 0.01$, Fig.5A,B)。Ki67- GAD67+ EdU+細胞の総数が照射群とコントロール群で差がないことから(Fig.5C)、大脳新皮質第一層の抑制性 NSPCs の分化と遊走を促進していることが示唆された。照射直後のウエスタンブロットでは、照射部位の p-Akt と Akt が非照射に比べ有意に増加した。2日後には Akt は減少し非照射コントロールと差がなくなり LLI による Akt 増加の効果が消失した(Fig.4B)

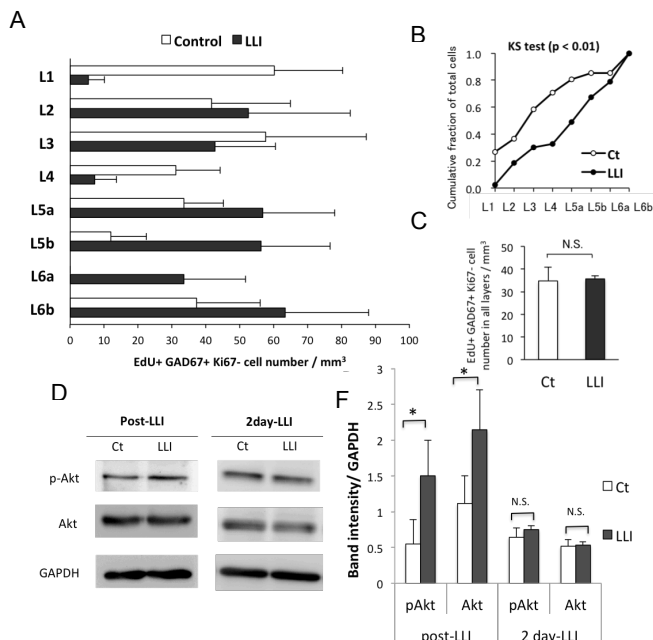


Fig. 5: 成体マウスに対する LLI 効果

4. 考察

532 nm LLI は、405 nm LLI が細胞死を促進し、808 nm LLI が細胞増殖を抑制するのとは反対に、細胞増殖を促進させた。培養細胞およびマウス脳の両方で Akt が増加されることが本研究から示された。Akt は、細胞種に応じて自己増殖もしくは分化を促進し、さらにはアポトーシスからの防御、細胞周期停止因子(p21)の抑制⁹⁾、などに幅広く関与している。LLI が Akt 経路に関連する報告は、632.8 nm LLI が PI3K/Akt 経路を介してアフリカミドリザル腎細胞(COS-7)の細胞増殖を照射量依存的に促進することや¹⁰⁾、632.8 nm LLI によって骨格筋細胞の p21 の発現が抑制されることが報告されている¹¹⁾。また、Akt は興奮性神経細胞になる NSPCs には自己増殖促進、抑制性神経細胞になる NSPCs には分化誘導促進として働くことが知られており、本実験の LLI が E10.5FB 由来 NSPCs には増殖促進を示し、E14.5GE 由来の NSPCs には細胞遊走を促進したことと一致する。532 nm LLI による Akt の活性化は2日後には減少しコントロールと同じ値となった。血液に対する 632.8 nm LLI の報告においても T 細胞と IL-2 濃度が1日目には増加したが、2日目には有意差がなくなっていた¹²⁾ことより、LLI の効果は一過性であることが示唆された。

6. 参考文献

- 1) Mester et al., *Orv Hetil*, 109: 2551-2,1968.
- 2) Karu T, *CRC*, 48.1-48.25, 2003.
- 3) Moore, et al., *LSM*, 36-8, 2005.
- 4) Sroka R, et al. *LSM*.;25(3):263-71,1999.
- 5) Xuan, et al, *PLoS One*, 8(1):e53454, 2013.
- 6) Murayama H,Kogure S,et al. *LMS*. 27(1):87-93, 2010.
- 7) Ang FY, Kogure S, et al. *LMS*. 27:935-942, 2011.
- 8) Salic A, Mitchison TJ, *PNAS*, 19;105(7):2415-20, 2008.
- 9) Hemmings BA, et al.,*CSHPB*,1;4(9):a011189, 2012.
- 10) Zhang L, et al., *J Cell Physiol*, 219:553-62, 2009.
- 11) Shefer G, et al, *J Cell Sci*.Apr 1;115(Pt 7):1461-9, 2002.
Oishi K et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13064-9,2009
- 12) Novoselova EG et al. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 22(1):33-8, 2006.