

## クロライドイオン輸送体活性化による神経突起伸長促進機構の解明

丸中 良典, 楠崎 克之, 新里 直美, 芦原 英司, 中島 謙一, 細木 誠之, 羽柴 光起

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

**概要** 近年の我々の研究により、フラボノイドは  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体やナトリウムチャネルをはじめとするイオン輸送体の発現や活性を調節することが示唆されている。一方、我々は、神経細胞における神経突起伸長には、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体が必須であることを明らかにした。本研究は、神経細胞における神経突起伸長に対するフラボノイドの作用に着目し、そのメカニズムの解明を目的に行われた研究である。神経分化のモデルである PC12 細胞にフラボノイドを作用させると、神経成長因子 NGF による神経突起伸長は有意に促進されることが明らかとなった。RNA 干渉法により  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体をノックダウンしておく、フラボノイドの効果は見られなくなった。また、フラボノイドにより、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体のタンパク質発現量は影響を受けなかった。これらの結果から、フラボノイドにより  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体活性が亢進し、それを介して神経突起伸長が促進されることが示唆された。本研究で得られた知見をもとに、より強力な  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体活性化剤を開発または探索することで、損傷神経の神経突起伸長を促せ、神経修復を促進することが可能であると期待される。

### 1. 研究目的

#### 1.1 研究の背景

フラボノイドは、**図 1** に示す様な基本骨格を持つ天然に存在する有機化合物の総称である。大豆、野菜類、果物類にフラボノイドは含まれており、日々の食事から、我々は比較的大量のフラボノイド類を摂取している。フラボノイドは細胞周期、アポトーシス、遺伝子発現などの様々な細胞機能を調節することが、近年の研究により明らかとなってきた。さらに、我々は、ある種のフラボノイドがイオン輸送を活性化することを明らかにした。特に、腎上皮および

気道上皮細胞において、フラボノイド(ゲニステイン, ケルセチン)は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体 (NKCC) および cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)  $\text{Cl}^-$  チャネルを活性化することを我々は明らかにした<sup>1),2)</sup>。

学習や記憶などの高度な脳機能を可能にしているのは、多数の神経細胞が神経突起を伸展し互いにシナプス接着することにより形成される神経回路によるところが大きい。神経細胞は分化時に、細胞体より神経突起を伸長する。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞は、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) で処理することにより神経

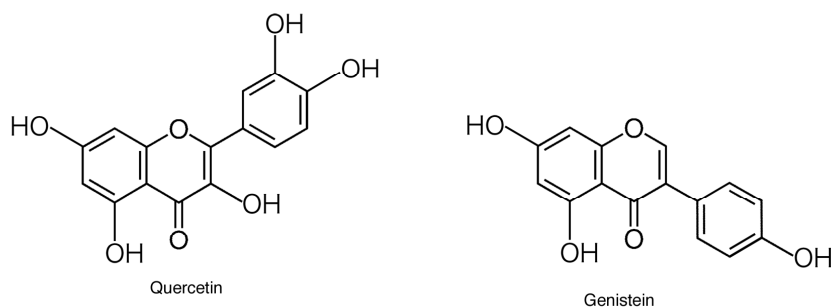


図 1. フラボノイドの構造

突起を伸長することから、神経分化・突起伸長のモデルとして広く研究に用いられている。近年、我々は、PC12 細胞(PC12 細胞の亜株)において NGF 処理が NKCC1 (NKCC isoform 1)の発現増加をもたらすこと、および NGF 誘因性神経突起伸長には NKCC1 が必須であることを明らかにした<sup>3)</sup>。

神経突起の伸長は、神経分化時のみならず、傷病により損傷した末梢神経が再生する際にも見られる現象である。これらの研究成果より、ある種のフラボノイドは NKCC1 の活性化剤として有用であり、このフラボノイドの NKCC1 の活性化効果を用いることで損傷神経の神経突起伸長を促せ、神経修復促進をもたらすことが可能であると考えられる。本研究においては、PC12 細胞における神経突起伸長に対するフラボノイドの作用に着目し、その詳細な分子機構解明を目指し、さらにフラボノイドによる神経修復促進(再生)方の開発を目指すものである。

## 1. 2 研究目的

フラボノイドの Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> 共輸送体活性化作用を基盤に、損傷神経修復促進を試みる。

## 1. 3 研究の意義

フラボノイドの Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> 共輸送体活性化作用を用いて、損傷神経の修復を促進させることが可能になれば、フラボノイドが損傷神経修復促進剤として使用可能になる。さらに、フラボノイドは副作用も少ないことが予想されるので、より安全な神経再生の方法を確立できることが期待される。

## 2. 研究方法

### 2. 1 実験材料

PC12 細胞(ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞)を用いた。D-MEM に 10% ウマ血清、5% ウシ血清、50 mg/ml gentamicin を培養液に添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で PC12 細胞を培養した。

### 2. 2 神経突起伸長の定量

PC12 細胞を poly-L-lysine コートしたカバーガラス上に播種し、一晚培養した。ケルセチン(2.5 mM または 10 mM)、またはゲニステイン(10 mM)あるいはコントロールとしてフラボノイドの溶媒である DMSO を 30 分間作用させた後、NGF (50 ng/ml)を添加してさらに 5 日間培養した。5 日後に細胞を固定し、神経突起の長さを顕微鏡下で計測

した。

### 2. 3 Western blotting

フラボノイドおよび NGF 処理した PC12 細胞を lysis buffer により可溶化した。Cell lysate のタンパク質は SDS-PAGE で分離した後 PVDF 膜に転写し、NKCC1 に対するモノクローナル抗体を用い、NKCC1 のタンパク質の発現レベルを定量した。

### 2. 4 RNA 干渉法(RNA interference)

PC12 細胞にラット NKCC1 に対する small interfering RNA (siRNA)を Lipofectamine 2000 試薬を用いてトランスフェクションした。24 時間後、(2)と同様にフラボノイドおよび NGF 処理を開始し、5 日後(siRNA トランスフェクションから 6 日後)に神経突起の伸長を計測した。また、(3)と同様に NKCC1 のタンパク質の発現レベルを定量した。

### 2. 5 NKCC 活性の測定

PC12 細胞をケルセチンおよび NGF で 24 時間処理した後、bumetanide(NKCC の特異的阻害剤)感受性 <sup>86</sup>Rb の取込みを測定することにより、NKCC1 活性を測定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 フラボノイドの神経突起伸長に及ぼす影響

PC12 細胞にケルセチン(2.5 mM および 10 mM)を作用させ、30 分後に NGF を添加した。NGF 添加から 5 日後の神経突起の長さを測定した。図 2 に示すように、ケルセチンを作用させると、突起の伸長は有意に促進された。また、その促進効果は濃度依存的であった(control; 40.9 ± 1.9 mm, 2.5 mM ケルセチン; 50.6 ± 2.6 mm, 10 mM ケルセチン; 55.6 ± 2.1 mm)。

同様にゲニステイン(10 mM)を作用させると、神経突起伸長は有意に促進した。また、10 mM ゲニステインの突起伸長に対する促進効果は、10 mM ケルセチンと比べると弱いものであった(control; 39.0 ± 1.9 mm, ケルセチン; 51.4 ± 2.3 mm, ゲニステイン; 46.4 ± 2.7 mm) (図 3)。

### 3. 2 フラボノイドの神経突起の長さ累計比率に及ぼす影響

図 4 は神経突起の長さの累計比率を示したものである。横軸に神経突起長、縦軸には横軸で示された数値以上の長さを持つ突起の割合をプロットしてある。フラボノイド処理によって、長い神経突起の割合が増加していることが認められた(図 4)。

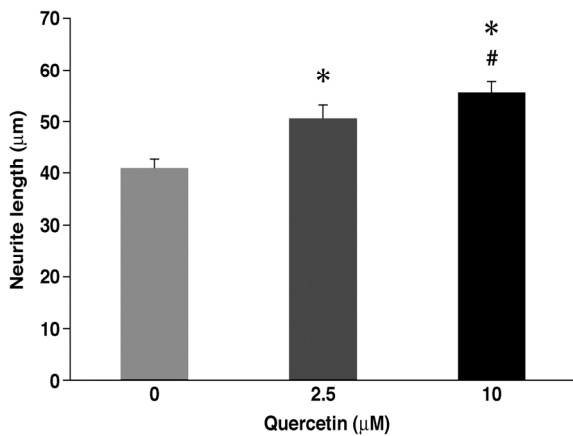


図 2. ケルセチンの神経突起伸張に及ぼす効果

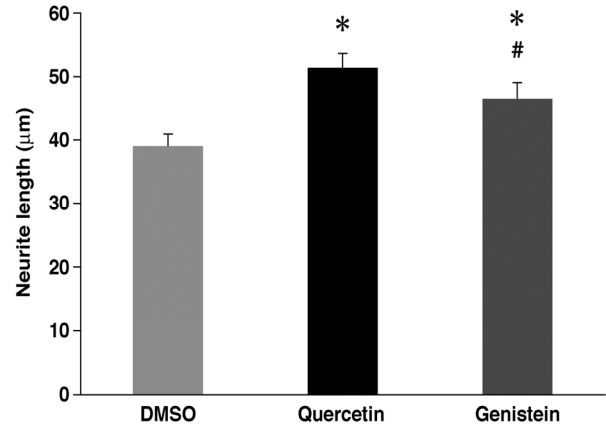


図 3. ケルセチンおよびゲニステインの神経突起伸張に及ぼす効果

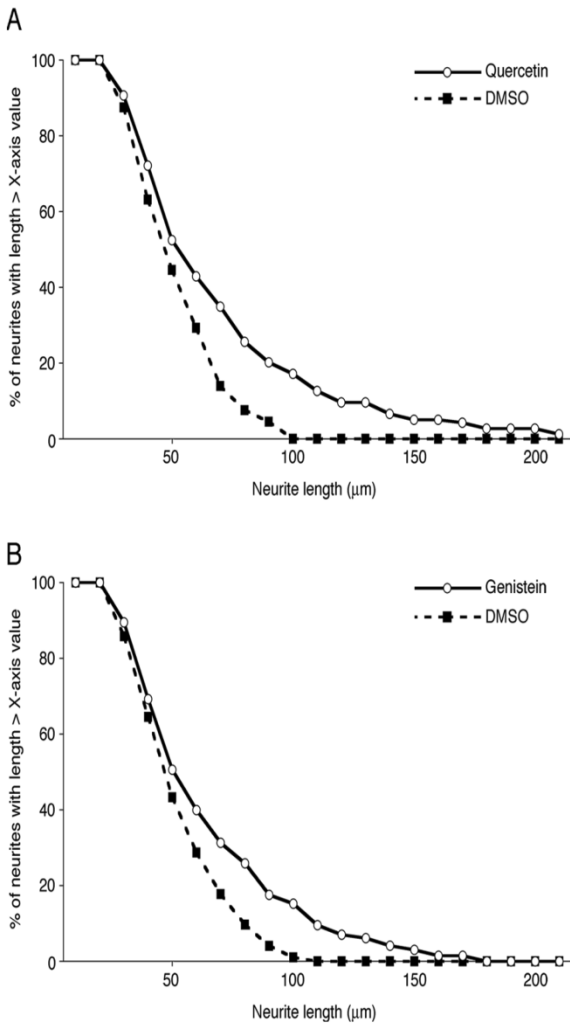


図 4. ケルセチン (A) およびゲニステイン (B) の神経突起の長さ累計比率に及ぼす影響

### 3. 3 NKCC1 に対する siRNA の NKCC1 発現および神経突起伸張に及ぼす影響

近年の研究により、フラボノイド類は、アポトーシス、遺伝子発現、細胞増殖、イオン輸送など様々な細胞機能に影響を与えることが明らかとなりつつある。特に、我々は、ケルセチン、アピゲニン、ルテオリン、ケンフェロールが腎上皮細胞および気道上皮細胞において NKCC1 を活性化することを明らかにしてきた<sup>1), 3)</sup>。一方、我々は、PC12D 細胞を NGF 処理すると NKCC1 の発現が増加すること、および NGF による神経突起伸長には NKCC1 が必須であることを明らかにした<sup>2)</sup>。これらの結果より、フラボノイド(ケルセチンおよびゲニステイン)により NKCC1 が活性化され、NKCC1 の活性化を介して神経突起伸長が促進されていることが示唆された。そこで、NKCC1 のノックダウンが、フラボノイドが有する神経突起伸長に対する促進効果に対してどのように影響するかを検証した。ラット NKCC1 に対する 2 種類の siRNA (siRNA1660, siRNA1921) を PC12 細胞にトランスフェクションすることにより、NKCC1 タンパク質発現レベルをコントロール (Mock) の 5-10% 程度にノックダウンすることができた (図 5A)。また、既知のほ乳類遺伝子にホモロジーのないコントロール siRNA (control oligo) をトランスフェクションした際には、NKCC1 タンパク質発現量の低下は見られなかった (図 5A)。siRNA をトランスフェクションした 24 時間後にフラボノイドと NGF 処理を開始し、5 日後の神経突起の長さを計測した。siRNA のトランスフェクションにより、フラボノイドの神経突起伸長に対する促

進効果はほぼ完全に見られなくなった(図 5B, C)。

次に、フラボノイド処理により、NKCC1 のタンパク質発現が増加するか否か、または活性が上昇するか否かを検証した。PC12 細胞をケルセチン(10 mM)と NGF で 5 日間処理し、NKCC1 の発現量を Western blotting で調べた。その結果、ケルセチン処理により NKCC1 の発現は影響を受けなかった(図 6A, B)。一方、ケルセチン処理により bumetanide 感受性  $^{86}\text{Rb}$  取込みは有意に増加した(図 6C)。これらの結果から、フラボノイドにより NKCC の活性が亢進し、それを介して神経突起の伸長が促進されることが強く

示唆された。

フラボノイドはその構造により、いくつかのサブカテゴリーに分類される。今回使用したケルセチンは「フラボノール」に属し、3-hydroxyflavone 骨格を持つ。一方、ゲニステインは「イソフラボン」に属し、isoflavone 骨格を持つ。本研究で得られた知見をもとに、より強力な NKCC 活性化剤を開発または探索することで、損傷神経の神経突起伸長を促せ、神経修復を促進することが可能であることが期待される。

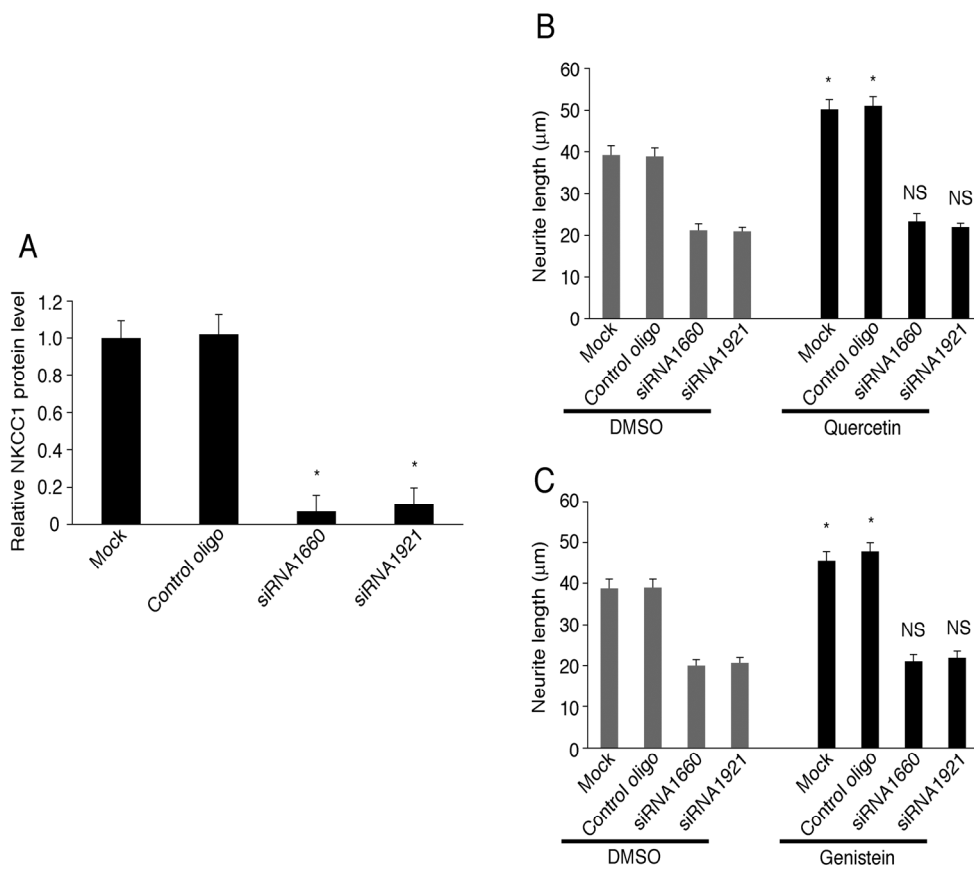


図 5. NKCC1 に対する siRNA の NKCC1 発現および神経突起伸長に及ぼす影響

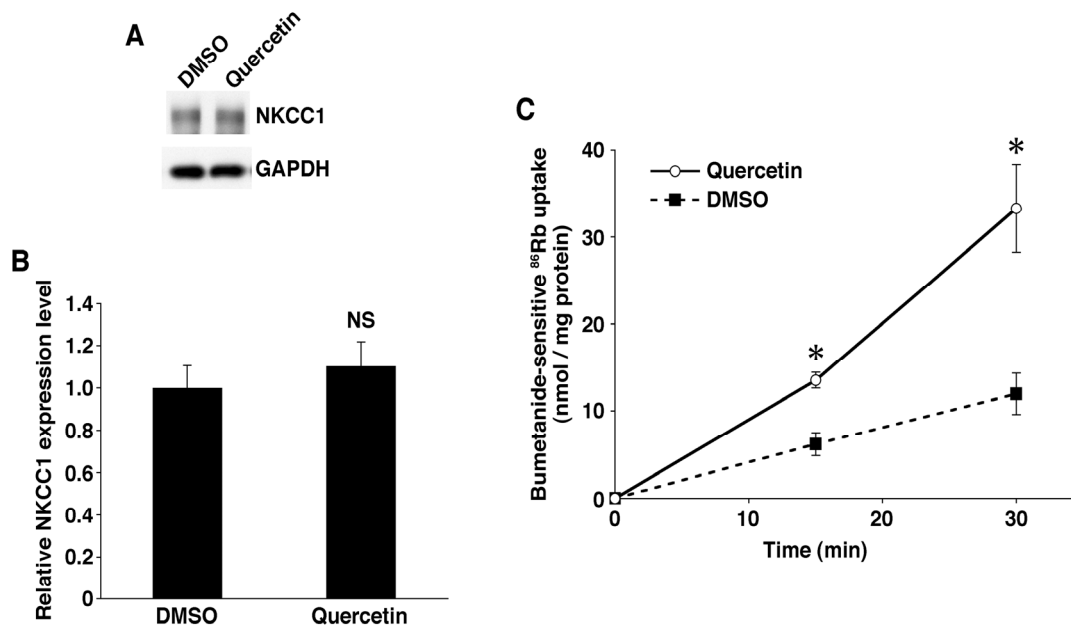


図 6. ケルセチンの NKCC1 遺伝子発現および活性に及ぼす影響

参考文献

1) Niisato N, Nishino H, Nishio K, Marunaka Y (2004): Cross talk of cAMP and flavone in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl<sup>-</sup> channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter in renal epithelial A6 cells. *Biochem Pharmacol*, **67**, 795-801.

2) Asano J, Niisato N, Nakajima K, Miyazaki H, Yasuda M, Iwasaki Y, Hama T, Dejima K, Hisa Y, Marunaka Y

(2009): Quercetin stimulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**:688-695.

3) Nakajima K, Miyazaki H, Niisato N, Marunaka Y (2007): Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 604-610.

## Stimulatory Mechanisms of Neurite Outgrowth by Activation of Cl<sup>-</sup> Transporters

Yoshinori Marunaka, Katsuyuki Kusuzaki, Naomi Niisato, Eishi Ashihara, Ken-ichi Nakajima,  
Shigekuni Hosogi, Mitsuoki Hashiba

Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science,  
Kyoto Prefectural University of Medicine

### Summary

We have recently reported that Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter isoform 1 (NKCC1) plays an essential role in nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth in PC12D cells. On the other hand, it has been reported that dietary flavonoids, such as quercetin, apigenin, and luteolin, stimulate various ion transporters. In the present report, we investigated the effect of quercetin, a flavonoid, on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells (the parental strain of PC12D cells). Quercetin stimulated the NGF-induced neurite outgrowth in a dose-dependent manner. Knock down of NKCC1 by RNAi methods abolished the stimulatory effect of flavonoid. Quercetin stimulated NKCC1 activity (measured as bumetanide-sensitive <sup>86</sup>Rb influx), without any increase in the expression level of NKCC1 protein. The stimulatory effect of quercetin on neurite outgrowth was depended upon extracellular Cl<sup>-</sup>. These observations indicate that quercetin stimulates the NGF-induced neurite outgrowth via an increase in Cl<sup>-</sup> incorporation into the intracellular space by activating NKCC1 in PC12 cell.