

フラボノイドによる神経再生の試み

丸中良典*・新里直美・宮崎裕明・中島謙一

京都府立医科大学大学院医学研究科

Flavonoids Stimulate NGF-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells

Yoshinori MARUNAKA, Naomi NIISATO,
Hiroaki MIYAZAKI and Ken-ichi NAKAJIMA

Graduate School of Medical Science,
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602-8566

ABSTRACT

During differentiation, neuronal cells undergo drastic shape changes. Typically, neuronal cells extend long membranous processes, named neurites. PC12 cells are derived from rat pheochromocytoma, and are a model useful for the study on neuronal differentiation and neuro-regeneration because PC12 cells extend neurites in response to nerve growth factor (NGF). We have recently reported that $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter isoform 1 (NKCC1) plays an essential role in NGF-induced neurite outgrowth of PC12D cells (a subclonal cell line of PC12). Flavonoids are plant pigments widely contained in soybean, fruits and vegetables. Recent studies have revealed that flavonoids modulate various cellular functions such as cell cycle progression, apoptosis, and gene expression. In addition, our previous studies have indicated that some flavonoids stimulate ion transport. Quercetin and genistein stimulate transepithelial Cl^- transport by activating NKCC1 and/or cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channel in renal and airway epithelial cells. These reports suggest that some flavonoids are one of possible activator of NKCC1. In the present study, we investigated the effect of flavonoids (quercetin and genistein) on NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. Quercetin stimulated the NGF-induced neurite outgrowth in a dose-dependent manner. Similarly, genistein also stimulated the neurite outgrowth, although the effect of genistein was slightly weaker than that of quercetin. Knock-down of NKCC1 by RNAi method abolished the stimulatory effect of these flavonoids. Treatment with quercetin had no effect on the protein expression of NKCC1. These

*〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町465

results indicate that flavonoids enhance the NGF-induced neurite outgrowth via the activation of NKCC1 on the plasma membrane. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 129-133, 2009.

Key words : PC12, Neurite outgrowth, Quercetin, Genistein, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter

フラボノイドは天然に存在する有機化合物の総称で、Fig. 1に示す様な基本骨格を持つ。フラボノイドは大豆、野菜類、果物類に含まれており、我々は日々の食事から、比較的大量のフラボノイド類を摂取している。近年の研究より、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明らかとなってきた。さらに、我々の研究により、ある種のフラボノイドが細胞におけるイオン輸送を活性化することが明らかとなった。特に、腎上皮および気道上皮細胞において、フラボノイド（ケルセチン、ゲニステイン）は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体（NKCC）およびcystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channelを活性化することを明らかにした^{1, 2)}。

学習や記憶などの高度な脳機能は、神経細胞の神経突起伸長およびシナプス形成による神経回路形成により維持されている。神経細胞はその分化の際に、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（NGF）で処理すると神経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幅広く用いられている。近年、我々は、PC12D細胞（PC12細胞の垂株）をNGF処理するとNKCC1（NKCC isoform 1）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³⁾。神経突起の伸長は分化時のみならず、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、フラボノイドを用いることで損傷神経の神経突起伸長を促せ、神経修復を促進することが可能であると示唆される。本研究では、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の解明を目的とし、さらにフラボノイドによる神経修復（再生）を目指すものである。

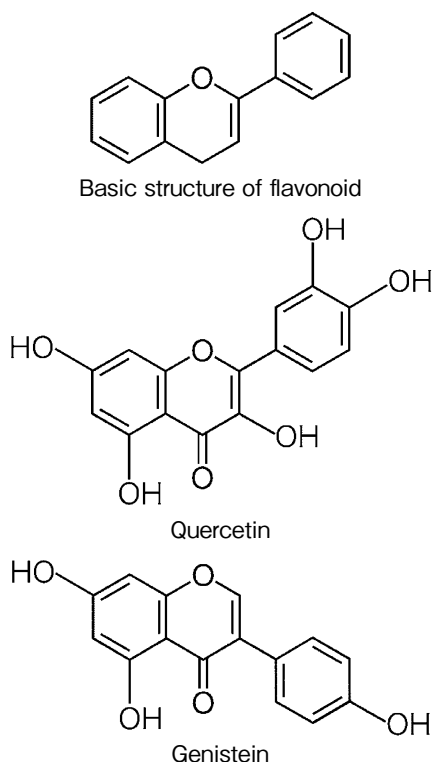


Fig. 1. Structure of flavonoid.

方 法

(1) 実験材料

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞を用いた。D-MEMに10%ウマ血清、5%ウシ血清、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicinを加えたものを培養液とし、37°C、5% CO_2 存在下で培養した。

(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、16～18時間培養した。ケルセチン（25 μM または10 μM ）、またはゲニステイン（10 μM ）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。

(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のたん白質の発現レベルを定量した。

(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 2,000試薬を用い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のたん白質の発現レベルを定量した。

結果と考察

PC12細胞にケルセチン (2.5 μ Mおよび10 μ M) 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。Fig. 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; $40.9 \pm 1.9 \mu$ m, 2.5 μ Mケルセチン; $50.6 \pm 2.6 \mu$ m, 10 μ Mケルセチン; $55.6 \pm 2.1 \mu$ m)。同様にゲニステイン (10 μ M) を作用させると、神経突起伸長は有意に促進した。また、10 μ Mゲニステインの突起伸長に対する促進効果は、10 μ Mケルセチンと比べると弱いものであった (control; $39.0 \pm 1.9 \mu$ m, ケルセチン; $51.4 \pm 2.3 \mu$ m, ゲニステイン; $46.4 \pm 2.7 \mu$ m) (Fig. 3)。Fig. 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 (Fig. 4)。

近年の研究により、フラボノイド類は、細胞増殖、アポトーシス、遺伝子発現、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^{1), 3)}。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²⁾。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、フラボノイドの効果 (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たん白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 (Fig. 5A-a, b)。また、既知のは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たん白質発現量の低下は見られなかった (Fig. 5A-aおよびA-b)。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処理を行い、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 (Fig. 5B-a, b)。

次に、フラボノイド処理により、NKCC1のたん白質発現が増加するか否かを検証した。PC12細胞をケルセチン (10 μ M) 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

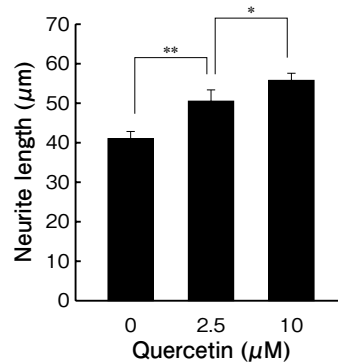


Fig. 2. Effect of quercetin on NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells.

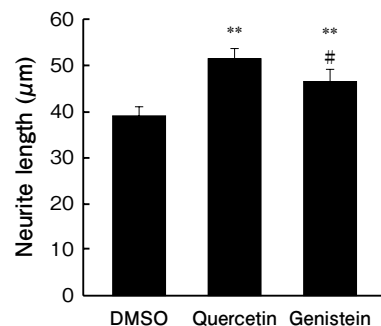


Fig. 3. Effect of quercetin and genistein on NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells.

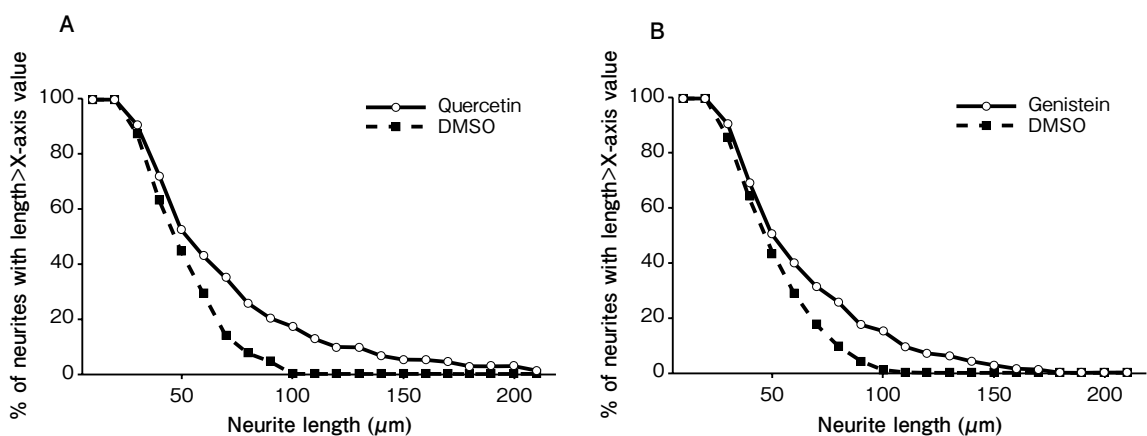


Fig. 4. A) Distribution of the neurite lengths in cells treated with DMSO and 10 μ M quercetin. B) Distribution of the neurite lengths in cells treated with DMSO and 10 μ M genistein.

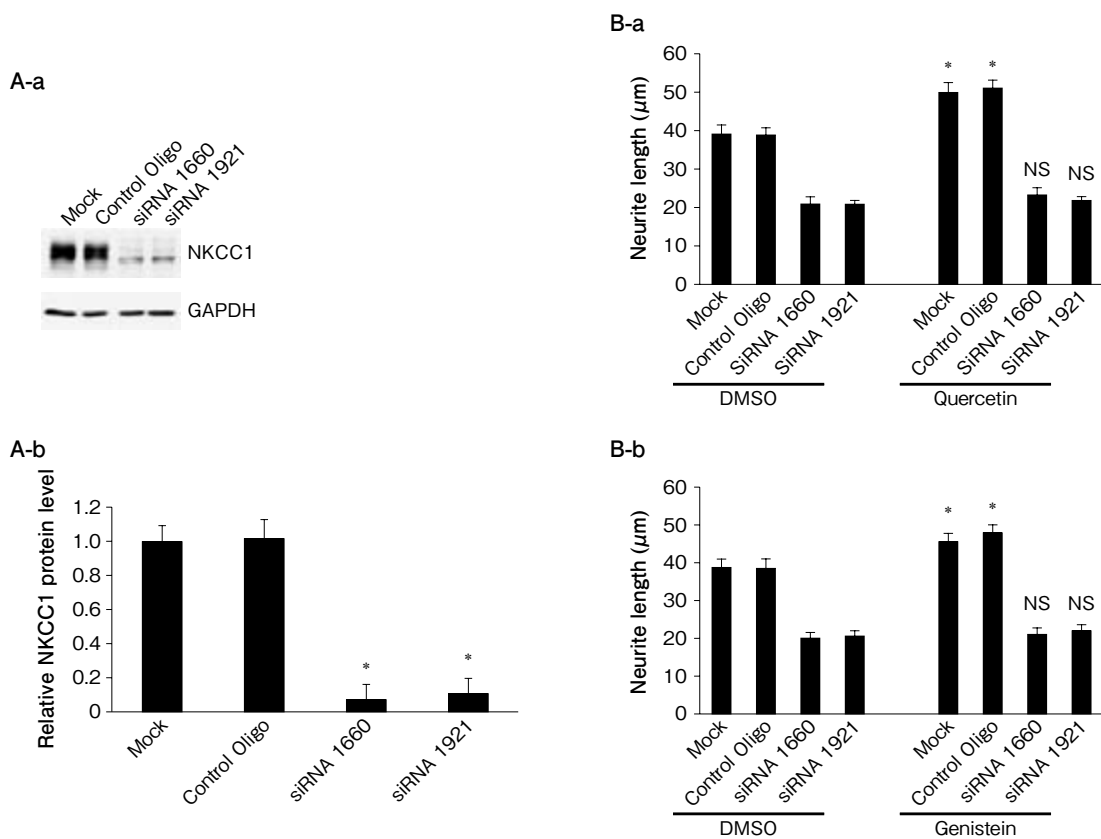


Fig. 5. Effect of transfection of NKCC1 siRNA on expression of NKCC1 protein (A) and on NGF-induced neurite outgrowth (B).

かった (Fig. 6). 以上の結果から, フラボノイドによりNKCC1の活性が亢進し, 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。

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。

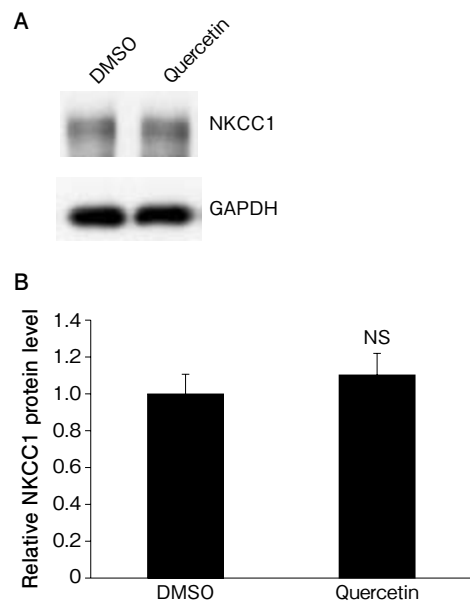


Fig. 6. Effect of quercetin on NKCC1 protein expression level of PC12 cells.

要 約

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と, 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, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体のたん白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。

文 献

- 1) Niisato N, Nishino H, Nishio K and Marunaka Y (2004): Cross talk of cAMP and flavone in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- channel and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 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 and Marunaka Y: Quercetin stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press.
- 3) Nakajima K, Miyazaki H, Niisato N and Marunaka Y (2007): Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 604-610.