

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月9日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01419

研究課題名(和文)低酸素環境が軸索内ミトコンドリアに与える影響

研究課題名(英文)Effect of hypoxia to axonal mitochondria in cultured dorsal root ganglion cells of rat

研究代表者

菊池 真(Kikuchi, Shin)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20404585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素は神経系などに大きなダメージを与える。我々は末梢神経細胞軸索内のミトコンドリアに着目し、低酸素環境におかれた軸索内ミトコンドリアの動態を、初代培養細胞を用いて観察した。酸素濃度が0.5%の環境に24時間暴露した結果、ミトコンドリアの移動数などに変化はみられなかった。そこで、疑似的に虚血を再現するため、低酸素発生装置と低グルコース培地を用い、低酸素・低グルコース(OGD)環境下で同様に観察した。その結果、24時間のOGD暴露は輸送ミトコンドリアの数を有意に減少させた。この結果、ミトコンドリア輸送は、単純な低酸素ではなくOGD刺激のような複合的刺激に抑制される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系における虚血は中枢神経では脳卒中や脳梗塞、末梢神経では糖尿病による末梢神経障害など、患者のQOLを低下させるものが多い。今回の研究計画はこれらの障害メカニズムを末梢神経軸索内のミトコンドリアの動態から解明しようとしたものである。我々の結果からは、低酸素のみの刺激は、末梢神経軸索の輸送ミトコンドリア数の変化を観察できなかった。さらに、低グルコースと低酸素を組み合わせた刺激では、輸送ミトコンドリア数の減少が観察された。これらの結果は、末梢神経軸索内の輸送ミトコンドリアは低酸素だけではなく低グルコースを組み合わせたようないくつかのメカニズムで制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia induces neuronal death in vivo. Mitochondria consume oxygen and produce ATP in living cell. In this study, we investigated the motility of axonal mitochondria under hypoxia. We used cultured dorsal root ganglion cells of rat and marked mitochondria in the axon with fluorescent protein by genetic engineering technique. The rate of motile mitochondria in axon under hypoxia showed no difference between contral. In addition, we investigated motile mitochondria in axon under glucose-oxygen deprivation (OGD) for 24 hours. OGD decreased the number of motile mitochondria in axons. Our results suggested that motility of mitochondria is not controlled by hypoxia only, but by complex mechanisms such as OGD.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：ミトコンドリア 末梢神経 軸索 OGD 低酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低酸素は神経の障害をひきおこし、筋力の低下や感覚障害などの麻痺の原因となる。リハビリテーション分野においてもこれらの神経障害による麻痺の適切な診断と運動療法は非常に重要である。このため、低酸素などによってひきおこされる神経障害のメカニズムを理解することはリハビリテーション分野にとって非常に重要である。近年、軸索内のミトコンドリアの異常が疾患に関与していることが報告されており、神経細胞体だけではなく軸索内の局所変化も重要であることが指摘されている。そこで今回、我々は低酸素が軸索内ミトコンドリアにどのような影響を与えるのかを、ラットの初代培養末梢神経細胞を用いて、観察することとした。加えて、虚血の状態も観察対象に加え、低グルコースと低酸素・低グルコース(Oxygen-glucose deprivation, OGD)、における影響も観察することとした。

2. 研究の目的

- (1)対照群 (Control) と比較して、低酸素 (Hypoxia) および低グルコース (Low Glucose) OGD が軸索内の輸送ミトコンドリアにどのような影響を与えるのかをタイムラプスイメージング法をもちいて明らかにする。
- (2)低酸素および OGD が軸索内ミトコンドリアの形態にどのような影響を与えるかを、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察する。

3. 研究の方法

動物実験および組換え遺伝子の使用にあたり所属機関の承認を得た。

軸索内のミトコンドリアの観察

(1)レンチウイルスベクターの作製

生細胞のミトコンドリアを標識するため、レンチウイルスベクターを用いた。ミトコンドリア移行シグナルと蛍光色素(DsRed2)をコードしたコンストラクトを Clontech 社より購入し、Invitrogen 社のレンチウイルスベクター作製キット (ViraPower HiPerform Lentiviral Expression System) を用い目的遺伝子をレンチウイルス内に構築し、実験に用いた。

(2)末梢神経細胞初代培養

胎生 18-20 日の SD ラット胎子を培養に用いた。培養は 37 °C、95% air+5% CO₂、湿度 100% の環境で行い、培養液は Neurobasal Medium (Life tech.) に Gluta Max と B27 およびビタミン C を添加したものをを用い、2-3 日おきに交換した。培養開始 4-5 週間後にレンチウイルスにより、目的遺伝子を末梢神経細胞に導入し、更に 2-3 週間培養を継続し、タイムラプスイメージングに用いた。

各群 (Control、Hypoxia、Low Glucose、OGD) の影響は、全体で 6 週間を経過した培養細胞に、対照群 (Cont)、0.5%酸素 (Hypoxia)、低グルコース (Low Glucose)、0.5%酸素と低グルコースを合わせた群 (OGD) を無血清培地および低酸素インキュベーターを用いて作成した。

(3)タイムラプスイメージングとデータ解析

タイムラプスイメージングは Axio Observer Z1 (ZEISS) を用い、ステージにはチャンバーを設置し、37 °C、湿度 100% の条件下で 95% air +5% CO₂ または、0.5% O₂+5% CO₂ 状態で観察した。観察前日に培養液を DMEM (high glucose) に交換し、タイムラプスイメージングを取得した。データは 6 秒間隔で 200 枚 (20 分間) 取得した (Pre)。その後、それぞれの条件下で 24 時間培養し、同じ軸索を同定し、同様の条件でイメージを取得した (Post)。

(4)透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

OGD 環境に 24 時間暴露した初代末梢神経培養細胞をグルタルアルおよびオスミウムで固定し、脱水、エポキシ包埋の後に薄切し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1)輸送ミトコンドリアの数の変化 (図 1, 2)

0.5%酸素群 (Hypoxia)、低グルコース群 (Low Glucose) および、対照群 (Control) の各群間において輸送ミトコンドリアの数に有意な差は観察されなかった。低酸素・低グルコース群 (OGD) では Control および Hypoxia と比較して、輸送ミトコンドリア数の有意な減少を観察できた。また、一部の OGD では輸送ミトコンドリアをもたない軸索

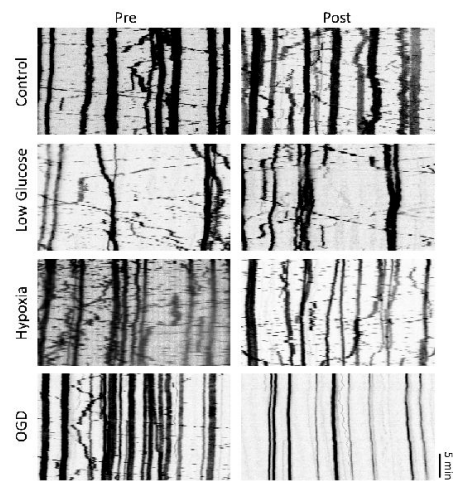


図 1. 各群の輸送ミトコンドリアの kymograph

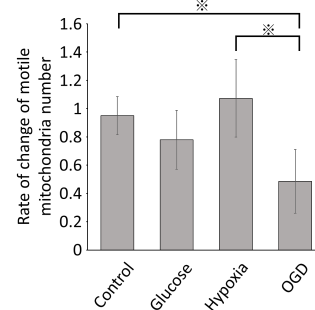


図 2. 各群の輸送ミトコンドリア数の変化量

も観察された。

(2)透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察 (図3)

TEM による軸索内ミトコンドリアの観察は、Control と OGD のみで行った。その結果、Control では、明瞭なクリステを有するミトコンドリアが観察されたが、OGD では膨化したミトコンドリアが観察された。加えて、OGD では、周囲の細胞のネクロシス像も観察された。

(3)まとめ

今回の実験では、24時間の低酸素(0.5%)のみの刺激では軸索内ミトコンドリアの輸送に大きな変化を与える可能性は低いことが示唆された。一方、24時間の OGD は輸送ミトコンドリアの数を減少させ、軸索内ミトコンドリアの形態を変化させる可能性が示された。また、同時に24時間の OGD では細胞のネクロシスも誘導する可能性も示唆したので、今後は、暴露時間を短くして、各群の軸索内ミトコンドリアの動態を観察することが必要だと考える。

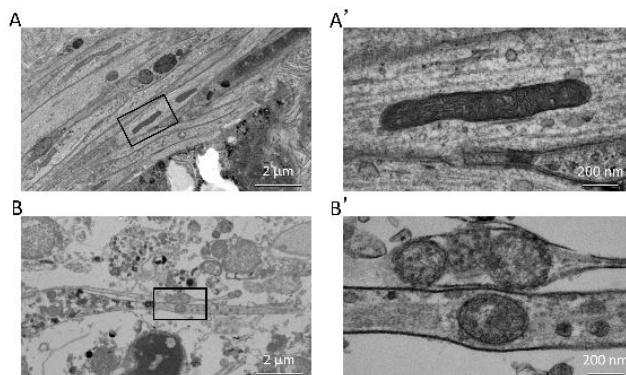


図3 . Control (A, A') と OGD (B, B') の軸索内ミトコンドリアの TEM 像

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Kakiuchi A, Takano K, Kakuki T, Kaneko Y, Konno T, Kohno T, Hosaka Y, Hata T, Kikuchi S, Ninomiya T, Himi T, Kojima T. Rho-kinase and PKC inhibition induces primary cilia elongation and alters the behavior of undifferentiated and differentiated temperature-sensitive mouse cochlear cells. *J Histochem Cytochem* (in press) (査読有) DOI: 10.1369/0022155419841013

Konari N, Nagaishi K, Kikuchi S, Fujimiya M. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells repairs renal tubules in diabetic nephropathy in vivo. *Sci Rep* 9 (1); 5184, 2019 (査読有) DOI: 10.1038/s41598-019-40163-y.

Kikuchi S, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, Tatsumi H. Cobalt Inhibits Motility of Axonal Mitochondria and Induces Axonal Degeneration in Cultured Dorsal Root Ganglion Cells of Rat. *Cell Biol Toxicol.* 34(2): 93-107, 2018(査読有) DOI: 10.1007/s10565-017-9402-0

Kaneko Y, Kohno T, Kakuki T, Takano K, Ogasawara N, Miyata R, Kikuchi S, Konno T, Ohkuni T, Yajima R, Kakiuchi A, Yokota S, Himi T, Kojima T. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells. *Sci Rep* 7 (1); 10935, 2017 (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-11481-w

Takano K, Kakuki T, Kaneko Y, Kohno T, Kikuchi S, Himi T, Kojima T. Histone deacetylase inhibition prevents cell death induced by loss of tricellular tight junction proteins in temperature-sensitive mouse cochlear cells. *PLoS One* 12 (8); e0182291, 2017 (査読有) DOI: 10.1371/journal.pone.0182291. eCollection 2017

Kohno T, Kikuchi S, Ninomiya T, Kojima T. The bicellular tensile force sorts the localization of LSR in bicellular and tricellular junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 1397; 185-194, 2017 (査読有) DOI: 10.1111/nyas.13362

[学会発表](計 6 件)

菊池 真、二宮孝文、辰巳治之。短時間の低グルコース・低酸素が軸索内のミトコンドリアに与える影響。第124回日本解剖学会総会；2019.3.27-29；新潟市（新潟県）

菊池 真、二宮孝文、辰巳治之。低酸素・低グルコース(OGD)による末梢神経軸索内ミトコンドリアの輸送異常。第123回日本解剖学会総会；2018.3.28-30；武蔵野市（東京都）

Konari N, Nagaishi K, Kikuchi S, Mizue Y, Chikenji T, Nakano M, Otani M, Saito Y, Fujimiya M. MITOCHONDRIA TRANSFER OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS INHIBITS APOPTOSIS IN PROXIMAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS IN DIABETIC NEPHROPATHY. INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH 2017 Annual Meeting; 2017. 6. 14-17; Boston (USA)

菊池 真、二宮孝文、辰巳治之。塩化コバルトによる末梢神経軸索内ミトコンドリアの機能不全。第122回日本解剖学会総会；2017.3.28-30；長崎市（長崎県）

菊池 真、二宮孝文、辰巳治之。塩化コバルトが軸索内ミトコンドリアと軸索変性に与える影響。第121回日本解剖学会総会；2016.3.28-30；郡山市（福島県）

二宮孝文、菊池 真、新倉謙一、竹内智恵、辰巳治之。膜透過性金ナノ粒子の特性 ~ 培養神経細胞における知見 ~。第121回日本解剖学会総会；2016.3.28-30；郡山市（福島県）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。