

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790059

研究課題名（和文）神経回路の形成異常における細胞内ミトコンドリア動態の関与の解明

研究課題名（英文）Role of mitochondria in neural circuit formation

## 研究代表者

小山 隆太 (KOYAMA RYUTA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90431890

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、乳幼児発作の培養切片モデルおよび個体動物モデル（マウスおよびラット）を利用して、過剰神経活動によるミトコンドリアの軸索内集積と、ATP 過剰産生による突起形成誘導の可能性を検証した。我々は、てんかん脳における神経軸索内ミトコンドリアの役割について、主に以下の点を明らかにした。

- ▶ 発作後、ミトコンドリアは軸索内に集積する。
- ▶ ミトコンドリアの集積は神経活動依存的である。
- ▶ 軸索終末より放出された脳由来神経栄養因子が、近接する軸索領域にミトコンドリアを集積させる。
- ▶ 集積したミトコンドリアは、軸索局所においてATPを産生し、軸索分枝を形成する。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we used *in vivo* and *in vitro* models (Muramatsu, Koyama and others., *Brain* 133:60–75, 2010) of neonatal seizures to test the hypothesis that abnormally increased mitochondrial numbers produce surplus ATP and induce axonal branches under hyperexcitable conditions. We have revealed that axonal mitochondria rewire neural circuits in the epileptic brain via the mechanisms highlighted below.

- ▶ Mitochondria accumulate in axons after seizures.
- ▶ The accumulation of axonal mitochondria is neuronal activity-dependent.
- ▶ Axons release neurotrophin to attract mitochondria in adjacent axonal shafts.
- ▶ Localized mitochondria induce and maintain axonal branches via ATP production.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学

## 1. 研究開始当初の背景

脳が正常な機能を発揮するためには、正確な神経回路が形成される必要がある。このためには、個々の神経細胞の形態形成が正常におこなわれる必要がある。多くの研究が細胞構造形成に関与する細胞外因子（軸索誘導因子等）に着目し、種々のタンパク質が同定されてきたが、細胞内因子及び細胞内外の因子の相互作用に関する知見は少ない。特に、多くの異所性神経回路の存在が知られるてんかん脳において、これらの知見は乏しかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内小器官であるミトコンドリアの細胞内挙動が神経細胞構造の形成と、これに引き続く神経回路の形成に関与する可能性及びそのメカニズムを解明することであった。特に、本研究では海馬神経回路形成における、脳由来神経栄養因子（BDNF）によるミトコンドリア動態の制御機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

- ▶ラット由来の海馬切片培養法を利用した、神経細胞軸索の構造形成とミトコンドリア動態のタイムラプス解析法。
- ▶乳幼児期マウスのけいれんモデルを利用した、てんかん脳における軸索分枝形成とミトコンドリア分布の解析法（免疫染色）。

## 4. 研究成果

歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維は通常CA3野へ投射する。しかし、側頭葉てんかん患者の歯状回では、苔状線維が多数の側枝を形成し、その後分子層へと投射する異常発芽が頻繁に観察される。異常発芽の形成には細胞内ミトコンドリアの分布異常による軸索形態制御の不全が関与すると仮説し、この検証をおこなった。

まず、苔状線維内でのミトコンドリアの局在を可視化するために、細胞膜移行性AcGFP及びミトコンドリア移行性DsRed発現プラスミドそれぞれを電気穿孔法により、培養切片中の顆粒細胞に同時に導入した。これにより、異常発芽の形成過程とミトコンドリア動態を経時的に同時に共焦点顕微鏡で観察することが可能になった。本系において、側枝形成とミトコンドリアの局在の関連を検証したところ、ミトコンドリアの局在部位から新たな側枝が出現する様子が観察された。

次に、GABA<sub>A</sub>受容体の阻害薬を処置することにより、培養切片にてんかん様状態を誘導したところ、苔状線維内のミトコンドリアの密度が上昇し、最終的な異常発芽の形成が確認

された。てんかん様状態においてミトコンドリアの局在を制御する因子として脳由来神経栄養因子（BDNF）の関与を検証した。まず、BDNFを被覆した微小ビーズを苔状線維に接触させると、その接触部位にミトコンドリアが局在し、その後、同部位より新たな側枝が形成される様子が観察された。これらの現象は、Trk受容体の阻害薬であるK252a及びBDNFの機能阻害抗体の存在下では確認されなかった。

また、異常発芽の形成へのATPの関与を直接的に検証した。まず、ピクロトキシンによる苔状線維の側枝の形成は、ATP産生阻害薬であるCCCP又はFCCPの共処置によって抑制された。さらに、電気穿孔法を用いてATPを顆粒細胞内に直接注入したところ、苔状線維の側枝数が増加した。

以上より、てんかん様状態を誘導した海馬切片培養系において、苔状線維の異常発芽には、BDNFによって局在化されたミトコンドリアによるATPの供給が必要であることが示された。ここで、BDNFの作用機序をより詳細に検証するため、まず、培養切片内の近接する顆粒細胞のBDNF発現レベルを調整することで、BDNFの由来を検証した。具体的には、一方の顆粒細胞のBDNF発現量をRNA干渉法で抑制したところ、同顆粒細胞由来の軸索終末と、もう一方の顆粒細胞の苔状線維の接触部位からの異常発芽形成が抑制されることを示した。逆に、一方の細胞のBDNFの発現を上昇させた場合には、他方の細胞における異常発芽の形成が促進された。

これらのことから、てんかん様状態において、BDNFは顆粒細胞の軸索（苔状線維）終末より放出され、これが近隣の細胞の苔状線維に作用し、異常発芽が誘導されることが示唆された。現在、以上のデータを纏めて国際論文に投稿し、審査の後、改訂実験を遂行中である。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

現在2報の論文が審査後、改訂実験中。

〔学会発表〕（計17件）

1. 小山隆太（世話人、オーガナイザー）、泉安彦

若手薬理学者による脳疾患への挑戦—  
分子から個体レベルに至る病態解明と  
創薬を目指して—

第 130 回日本薬学会 (岡山) 2010 年 3  
月 29 日、S61

2. 小山隆太

てんかん脳の歯状回における異所性神  
経回路の形成

第 32 回日本神経科学大会  
(Neuroscience2009) (名古屋) 2009 年  
9 月 18 日、SY3-F2-4

3. 小山隆太、中原聡一郎、田中謙二、鍋倉

淳一、伊関峰生、渡辺正勝、松木則夫  
てんかん脳における cAMP 依存的な神  
経細胞の構造的可塑性

第 2 回光操作研究会 (第 33 回 Neuro2010  
サテライトシンポジウム) (岡崎) 2010  
年 9 月 9 日 (口演)

4. 田尾賢太郎、松木則夫、小山隆太

神経活動依存的なミトコンドリア動態  
の軸索形態形成への関与

第 33 回日本神経科学大会 (神戸) 2010  
年 9 月 2 日、P1-e15

5. 中原聡一郎、松木則夫、小山隆太

てんかん脳における BDNF 依存的な  
ミトコンドリア局在化と異所性神経回  
路形成

第 122 回日本薬理学会関東部会 (静岡)  
2010 年 6 月 5 日、MS1-1 (口演)

6. 中原聡一郎、松木則夫、小山隆太

てんかん脳における BDNF 依存的な  
ミトコンドリア局在化と異所性神経回

路形成

第 122 回日本薬理学会関東部会 (静岡)  
2010 年 6 月 5 日、MS1-1 (口演)

7. 田尾賢太郎、松木則夫、小山隆太

神経活動依存的なミトコンドリア動態  
の制御による軸索形態形成

東京大学生命科学研究ネットワークシ  
ンポジウム 2010 (東京) 2010 年 5 月 1  
日、PA-082

8. 小山隆太、松木則夫

苔状線維の異常発芽における軸索誘導  
メカニズムの解明

第 18 回海馬と高次機能学会 (金沢)  
2009 年 11 月 22 日、セッション 5-1 (口  
演)

9. 中原聡一郎、松木則夫、小山隆太

軸索内ミトコンドリア局在化による歯  
状回神経回路の再編成

第 18 回海馬と高次機能学会 (金沢)  
2009 年 11 月 22 日、セッション 5-2 (口  
演)

10. 中原聡一郎、松木則夫、小山隆太

脳由来神経栄養因子によるミトコンド  
リアの局在を介した苔状線維異常発芽  
の制御

第 43 回日本てんかん学会 (弘前) 2009  
年 10 月 23 日、P2-8

11. 田尾賢太郎、松木則夫、小山隆太

ミトコンドリア輸送の調節による軸索  
形態形成の制御

第 32 回日本神経科学大会 (名古屋)  
2009 年 9 月 18 日、P3-a06

12. 中原聡一郎、松木則夫、**小山隆太**  
海馬苔状線維の異常発芽におけるミトコンドリアの関与の解明  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2009 (東京) **2009** 年 8 月 24 日、A-21  
(口演)
13. 中原聡一郎、松木則夫、**小山隆太**  
脳由来神経栄養因子によるミトコンドリアの局在を介した軸索側枝形成の制御  
平成 21 年度生理学研究所研究会 神経科学の新しい解析法とその応用 (岡崎)  
**2009** 年 7 月 16 日、O1-2 (口演)
14. 田尾賢太郎、松木則夫、**小山隆太**  
ミトコンドリア動態による軸索形態形成の制御  
第 120 回日本薬理学会関東部会 (東京)  
**2009** 年 7 月 11 日、P33 (ショートトーク + ポスター)
15. Tao K., Matsuki N and **Koyama R.**  
Activity-dependent mitochondrial dynamics regulate axonal branch formation  
第 1 回東北大学脳科学国際シンポジウム (仙台) **2011** 年 1 月 21 日、P-M18
16. Tao K., Matsuki N and **Koyama R.**  
Neuronal activity-dependent mitochondrial redistribution regulates axonal morphogenesis  
第 40 回北米神経科学学会年会 (サンディエゴ) **2010** 年 11 月 15 日、332.4
17. Tao K., Matsuki N and **Koyama R.**  
Mitochondrial dynamics regulates hippocampal mossy fiber morphogenesis.

第 39 回北米神経科学学会年会 (シカゴ)

**2009** 年 10 月 19 日、311.3

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

学会発表 1 は、ハイライトシンポジウムに採択された。

学会発表 10 は、優秀発表賞に選ばれた。

学会発表 12 は、優秀発表賞に選ばれた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 隆太 (KOYAMA RYUTA )

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 90431890

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: