

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19310

研究課題名（和文）損傷運動ニューロンのリプログラミングに関わる遺伝子発現制御機構の網羅的解析

研究課題名（英文）The reprogramming mechanism of damaged motor neurons

研究代表者

桐生 寿美子（Sumiko, Kiryu-Seo）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70311529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では神経損傷を受けた運動ニューロンが再生能力を賦活化するため一旦未熟な状態に若返るメカニズムの一端を明らかにすることを目指した。このプロセスでは多様な損傷応答反応が協調して引き起こされるが、そのうちのどれか一つでも破綻すると変性・脱落が惹起されると考えられる。そこで同じ神経損傷に対して再生・変性と逆の運命を辿るようデザインした2種類のマウスを用い、再生か変性かを決定する分岐点となるメカニズムを探索した。その結果、当初の予想とは異なるものの損傷運動ニューロンがタンパク質分解を介して一旦未熟な状態に逆戻りし神経再生を促すエネルギーを確保する新しいメカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

損傷や変性疾患、老化によりダメージを受けた神経細胞が変性に至る過程は様々である。損傷ニューロンが神経変性を免れ神経再生を適切に進行させることができれば神経ネットワークに再び組み込まれるポテンシャルは高い。このため神経再生能力を賦活化するメカニズムを理解することは神経再生のロードマップ作成を目指す上で極めて意義が高く、再生医療や予防医療の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism by which damaged motor neurons transit to an immature state to activate their regenerative capacity. In this process, various damage responses occurred in a coordinated manner, and the failure of any one of the damage responses is considered to induce degeneration. We searched for the mechanism using two types of mice that were designed to be destined for regeneration or degeneration in response to nerve injury. We found a new mechanism in which damaged motor neurons use proteolysis to transit to an immature state and satisfy energy demand in injured axons.

研究分野：神経科学

キーワード：神経損傷 運動ニューロン タンパク質分解

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成熟運動ニューロンは、神経系の中では例外的に神経損傷を受けても再生・修復することが可能である。神経損傷を受けた運動ニューロンは、一旦未熟な状態に若返ることで潜在的な再生能力を賦活化する一種の“セルフプログラミング”機構を備えているのではないかと考えられる。このプロセスは遺伝子レベル、蛋白質レベル、オルガネラレベル、さらには細胞間相互作用レベルに至るまで複数階層に渡った損傷応答反応により協調して引き起こされる。一方、運動ニューロン変性疾患である ALS 運動ニューロンも疾患によるダメージに応答し神経損傷を受けた運動ニューロンと共通の損傷応答を数多く惹起するが、変性・脱落を引き起こす。これは複数階層のいずれかの損傷応答が破綻しリプログラミングの進行が阻まれているためである可能性が高い。このような多階層にわたり制御される損傷ニューロンの再生・修復を理解するには多種多様な細胞が混在する *in vivo* で研究を進める必要があり、そのため損傷ニューロン特異的に遺伝子操作できるツールが必要となってくる。私たちが作製した Atf3:BAC Tg マウスはこうした *in vivo* での神経再生・変性研究に極めて有用なツールである。Atf3:BAC Tg マウスは神経損傷に鋭敏に応答する転写因子 Atf3 遺伝子の発現制御を忠実に模倣し、損傷を受けたニューロン特異的にミトコンドリアを GFP 標識すると同時に cre リコンビナーゼを発現誘導し特定遺伝子発現を ON/OFF 制御できる。ミトコンドリアをレポーターとすることでそのダイナミクスから神経細胞の状態を窺い知ることも可能である。

このマウスシステムを利用しシンプルで再現性の高い神経損傷モデルで、再生運動ニューロンと変性運動ニューロンとの間の相違からリプログラミング機構を明らかにできるのではないかと考えた。そこで ALS をはじめとした神経変性疾患ではプロテアソーム機能不全に陥ることが広く認知されていることに着目した。ALS 運動ニューロンはプロテアソーム機能不全のため疾患によるダメージにうまく対応できず変性脱落に至ると考えられるからである。Atf3:BAC Tg マウスを用いて損傷運動ニューロン特異的にプロテアソームを欠損するマウスを作製したところ、ALS 様の変性脱落を引き起こすことが明らかになった。これにより神経損傷モデルを用いて再生運動ニューロン、変性運動ニューロンを遺伝子発現レベルから細胞間相互作用レベルに至るまで比較することが可能になり、リプログラミングに関わるメカニズムの一端を解明できると考えた。さらに Atf3:BAC Tg マウスを筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスと交配すると、神経損傷せずとも疾患によるダメージに応答して ATF3 を発現誘導する脆弱性の高い変性運動ニューロンを選択的に GFP 標識することも明らかになった。このため神経損傷モデルを用いて明らかになったリプログラミング機構の作動状態を ALS 運動ニューロンで検証することも可能になった。これらツールが揃った状況で、これまで不明であったリプログラミングメカニズムの一端を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、同じ神経損傷に対して耐性を持ち再生可能な運動ニューロンと ALS 様の変性脱落を示す運動ニューロンとを比較し、再生能力を賦活化するリプログラミングに関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスモデル

神経損傷応答転写因子 ATF3 の遺伝子発現制御を保持し、損傷神経細胞特異的にミトコンドリアを GFP 標識すると同時に cre リコンビナーゼを発現する Atf3:BAC Tg マウスと損傷神経細胞特異的にプロテアソームサブユニットの一つである Rpt3 を欠損するマウス (Rpt3 CKO マウス、Atf3:BAC Tg マウスと Rpt3 flox マウスを交配) を用いた。Rpt3 flox マウスは京都大学高橋良輔先生より供与していただいた。Atf3:BAC Tg マウスと ALS モデルマウスである SOD1^{G93A} マウスとを交配し脆弱性の高い変性運動ニューロンを選択的に GFP 標識する Atf3:BAC; SOD1^{G93A} マウスを得た。

Atf3:BAC Tg マウスと Rpt3 CKO マウスの片側舌下神経を切断し、舌下神経損傷モデルを作製した。

(2) 神経再生関連遺伝子発現解析

健常側と損傷側の舌下神経核を回収し神経再生関連遺伝子の mRNA 発現変動を定量 PCR にて、タンパク質発現変動をウエスタンブロットにて解析した。

(3) 組織学的解析

マウスの神経損傷数日後 Zamboni 固定液で灌流固定し切片を作製し免疫組織科学を行った。損傷神経内のミトコンドリア数を評価する際は染色をすることなく軸索をホールマウントで観察した。さらに灌流固定後の脳を Cubic 試薬により透明化し、Lightsheet 顕微鏡にて GFP 標識された損傷運動ニューロンおよび軸索内のミトコンドリアを可視化した。

4. 研究成果

研究開始当初、神経再生・変性の分岐点にはゲノムレベルでの遺伝子発現制御の相違が関与するのではないかと考えた。そこでまず、Atf3:BAC Tg マウスと損傷運動ニューロン特異的プロテアソーム欠損マウス (Rpt3 CKO) の舌下神経損傷後、それぞれのマウス約 10 匹から舌下神経核を回収し神経再生関連遺伝子の発現動態をスクリーニングした。予想に反し、再生・変性の運命の違いに関わらず、いずれのマウス運動ニューロンも神経損傷に対して同様の遺伝子発現制御を示すことが明らかになった。ところが、プロテアソームを欠損した損傷運動ニューロンはその後 p62 や TDP43 の蓄積を示し変性脱落した。このことは、変性脱落に至る損傷運動ニューロンであってもゲノム～転写レベルで一旦はリプログラミング機構のスイッチが入ることを示唆していた。そこで転写レベル以降に目を向け再生と変性の分岐ポイントにあるメカニズムを探索した。

舌下神経損傷後の Atf3:BAC Tg マウスと Rpt3 CKO マウスの脳を透明化すると、3次元で GFP 標識された損傷ニューロンおよび軸索を可視化しミトコンドリア動態をモニターすることが可能である (図 1)。透明化脳を観察した結果、プロテアソームを欠損した損傷運動ニューロン軸索内の GFP 標識ミトコンドリアの数が顕著に減少することが明らかになった。この理由として、軸索の根元にある特殊構造である軸索初節 (AIS) に局在するタンパク質が神経損傷にตอบสนองした運動ニューロン内でプロテアソームの標的となっており、プロテアソームを欠損した損傷運動ニューロンでは AIS タンパク質を分解できないためであることを突き止めた。AIS は成熟ニューロン軸索の根元で細胞体から軸索末端に輸送される物資を選別するゲートとして機能すると考えられている。神経再生時の軸索では大量にエネルギーを必要とするため非常に多くのミトコンドリア供給が必要とされる。このエネルギー需要を満たすため一時的に AIS のゲート構造が壊され軸索へのミトコンドリア流入の制限が解除されることが明らかになった。しかし、プロテアソームを欠損すると損傷にตอบสนองして AIS を分解することができないためこのメカニズムが作動せず、ミトコンドリアが十分量軸索へ輸送されず結果として変性に至ることが明らかになった。プロテアソーム欠損損傷運動ニューロンで分解されず残存している AIS を shRNA により強制的に抑制すると、軸索内へのミトコンドリア流入は増加した。さらに、疾患によるダメージを受けた ALS マウス運動ニューロンでもプロテアソーム欠損損傷運動ニューロン同様に AIS が分解されずに残存することが明らかになった。AIS は成熟ニューロン特有の構造であり未熟なニューロンには存在しない。したがって損傷にตอบสนองした運動ニューロンは再生に必要なエネルギーを確保するために敢えて AIS を分解し自らを未熟な状態に逆戻りさせると考えられる (図 2)。当初の予想とは異なる仕組みではあったが、タンパク質レベルでのリプログラミング機構が本研究により明らかになった。

研究開始当初、ゲノムレベルでの遺伝子発現制御からリプログラミング機構を明らかにするため、GFP で標識される損傷運動ニューロンを sorting しゲノムや転写産物を解析することを試みた。しかしサンプル調整法を改善しても sorting を行う過程で損傷運動ニューロンの viability、回収効率が著しく低下した。このため Atf3:BAC Tg マウスを用いて損傷運動ニューロンの核を特異的に蛍光標識するマウスを作製し、損傷運動ニューロンの核を sorting しゲノムレベルでの解析をする方法に切り替えることにした。これについては期間中に終了しなかったため今後の課題として残された。

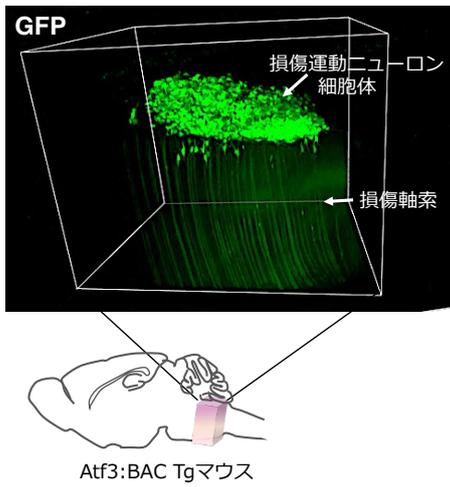


図1 Atf3:BAC Tgマウス脳の透明化3次元画像
損傷運動ニューロン特異的にミトコンドリアが蛍光標識される

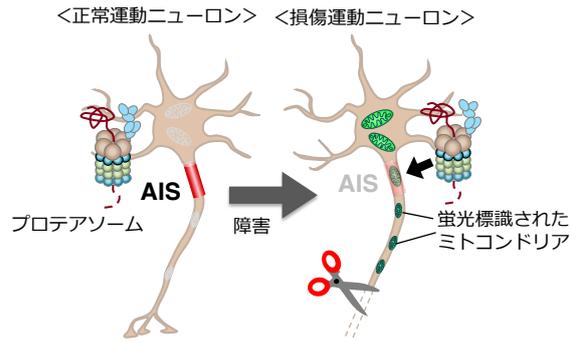


図2 損傷運動ニューロンのリプログラミングを促すメカニズム
損傷を受けた運動ニューロンは成熟ニューロンの特徴であるAISを積極的に壊し神経再生能力を賦活化する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Koji Wakatsuki, Sumiko Kiryu-Seo, Masaya Yasui, Hiroki Yokota, Haruka Kida, Hiroyuki Konishi, Hiroshi Kiyama | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Repeated cold stress, an animal model for fibromyalgia, elicits proprioceptor-induced chronic pain with microglial activation in mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 J Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-024-03018-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fan Q, Takarada-Iemata M, Okitani N, Tamatani T, Ishii H, Hattori T, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Hori O | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Brain injury triggers cell-type-specific and time-dependent endoplasmic reticulum stress responses. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Glia | 6. 最初と最後の頁 667-681 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24303 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Shishioh N, Kiryu-Seo S, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Kiyama H | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Expression of ATP-binding cassette transporter A1 is induced by nerve injury and its deficiency affects neurite tip morphology and elongation in cultured neurons. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Chemical Neuroanat | 6. 最初と最後の頁 102164 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jchemneu.2022.102164 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kiryu-Seo S, Matsushita R, Tashiro R, Yoshimura T, Iguchi Y, Katsuno M, Ryosuke Takahashi R, Kiyama H | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Impaired disassembly of the axon initial segment restricts mitochondrial entry into damaged axons. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 EMBO J | 6. 最初と最後の頁 e110486 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2021110486 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Tamada H, Kiryu-Seo S, Sawada S, Kiyama H | 4. 巻 529 |
| 2. 論文標題 Axonal injury alters the extracellular glial environment of the axon initial segment and allows substantial mitochondrial influx into axon initial segment | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Comp Neurol | 6. 最初と最後の頁 3621-3632 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25212 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Koinuma S, Negishi R, Nomura R, Sato K, Kojima T, Segi-Nishida E, Goitsuka R, Iwakura Y, Wada N, Koriyama Y, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakamura T | 4. 巻 157 |
| 2. 論文標題 TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron-autonomous manner | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Neurochem | 6. 最初と最後の頁 1196-1206 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15235 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 若月康次、安井正佐也、桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性線維筋痛症モデルにおける発症機序の解析とミクログリア除去による疼痛抑制 |
| 3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、Nguyen Thu Tra、高橋良輔、勝野雅央、木山博資 |
| 2. 発表標題 ALS感覚ニューロンがプロテアソーム機能不全に対して耐性を示す仕組み |
| 3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 桐生寿美子 |
| 2. 発表標題 マウス脳内でのダメージに対する緊急応答メカニズム |
| 3. 学会等名 生理学研究所部門公開セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桐生寿美子 |
| 2. 発表標題 神経損傷に応答したニューロンの若返りと神経再生能力の賦活化 |
| 3. 学会等名 学術変革 3 領域（グリアデコード・臨界期生物学・適応回路センサス）合同シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 桐生寿美子 |
| 2. 発表標題 ダメージ応答メカニズムに光を当てた神経再生・変性研究 |
| 3. 学会等名 生理学研究所研究会 多次元脳形態研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 桐生寿美子 |
| 2. 発表標題 組織損傷における神経再生・変性メカニズム |
| 3. 学会等名 第42回日本認知症学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、永田健一、榎本篤、木山博資 |
| 2. 発表標題 組織損傷を感知して作動する神経依存性組織修復メカニズム |
| 3. 学会等名 第 13 回名古屋大学大学院医学系研究科・生理学研究所 合同シンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 軸索初節のダイナミクスと神経再生・変性 |
| 3. 学会等名 第46回日本神経科学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 組織損傷にตอบสนองしてスイッチオンされる神経依存性創傷治癒 |
| 3. 学会等名 第66回日本神経化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 若月康次、安井正佐也、桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性線維筋痛症モデルにおけるミクログリア除去による疼痛抑制 |
| 3. 学会等名 日本疲労学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 軸索初節の分解と神経再生・変性 |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama |
| 2. 発表標題 The plasticity of the axon initial segment during neurodegeneration and neuroinflammation |
| 3. 学会等名 Neuro2022（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromi Tamada, Sumiko Kiryu-Seo, Sohgo Sawada, Hiroshi Kiyama |
| 2. 発表標題 Morphological analyses for mitochondrial localization in the axon initial segments (AIS) of nerve injured-motor neuron and microglial activation around AIS |
| 3. 学会等名 Neuro2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鯉沼真吾、宮地美沙、保科光、前澤創、和田直之、竹村裕、郡山恵樹、桐生寿美子、木山博資、五十嵐道弘、中村岳史 |
| 2. 発表標題 TC10は小胞上からの特異的なシグナル伝達経路による微小管の安定化を介して軸索伸長を促進する |
| 3. 学会等名 Neuro2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資 |
| 2. 発表標題 障害を受けた運動ニューロンが軸索変性を免れる新たな仕組み |
| 3. 学会等名 第12回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama |
| 2. 発表標題 The dynamics of the AIS during neuronal injury |
| 3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Reika Matsushita, Yoshitaka Tashiro, Ryosuke Takahash, Takeshi Yoshimura, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Hiroshi Kiyama |
| 2. 発表標題 Injured motor neurons lose polarity in a proteasome-dependent manner to increase the mitochondrial transport into regenerative axons |
| 3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/ 第98回日本生理学会大会合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Wakatsuki, Masaya Yasui, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama |
| 2. 発表標題 Analysis of pain mechanism in an animal model for the fibromyalgia induced by repeated cold stress |
| 3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/ 第98回日本生理学会大会合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷川将暉, 桐生寿美子, 永田健一, 木山博資 |
| 2. 発表標題 様々な神経損傷に応答するプロテアーゼDINEの損傷運動ニューロン軸索再生効果 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会第81回中部支部学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |