

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750207

研究課題名(和文) 擬似虚血下における末梢神経初代培養細胞軸索内ミトコンドリアの変化

研究課題名(英文) Pseudo-ischemia induced axonal mitochondria changes in cultured dorsal root ganglion neurons

研究代表者

菊池 真 (Kikuchi, Shin)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20404585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血による神経の損傷は、中枢や末梢に関わらず、リハビリテーションの対象となり、そのメカニズムを解明することは非常に重要である。我々は、細胞内の低酸素性誘導因子(HIF-1a)を誘発するとされるコバルト(Co)が、培養末梢神経細胞の軸索内ミトコンドリア(Mt)および軸索変性に与える影響を観察した。その結果、高濃度のCoは軸索内の輸送Mtの数および停留Mtの長さを減少させ、軸索変性の指標の1つである軸索腫脹の数を増加させた。また、電子顕微鏡による観察の結果、Mtの構造が破壊されていた。現在、本結果がCoにより誘発された低酸素性誘導因子の影響か、Coそのものの影響なのかを検討中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated that the effects of cobalt, considered to an inducer of hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a), on the axonal degeneration and mitochondrial dynamics in cultured peripheral nervous axons. Twenty-four hours exposure of cobalt decreased the rate of the motile mitochondria in the axons. Of particular note, the 800  $\mu$ M cobalt density suppressed the axonal mitochondria transport completely. The observation of microstructure with the transmission electron microscope found that high density cobalt destroyed the architecture of axonal mitochondria. In the axons treated with cobalt, the number of axonal swelling was associated with the increase of cobalt concentration. Although the mechanisms of neurotoxicity induced by cobalt are not clear, our results showed that high cobalt concentrations reduced mitochondria transport and induced axonal degeneration.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：末梢神経 ミトコンドリア 初代培養細胞 コバルト

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素や虚血は神経の損傷をひきおこし、筋力の低下や感覚障害などの麻痺の原因となる。この神経障害のメカニズムを理解することは麻痺の改善・予防を目的とする理学療法において非常に重要である。近年、軸索内のミトコンドリアの動態が多くの神経疾患に関与していることが明らかとなり、また、神経細胞周囲の環境も神経細胞のミトコンドリアの動態に影響を与える。

コバルトは人体にとって、必須微量元素であり、ビタミン B12 (コバラミン) として、摂取され、欠乏は巨赤芽球性貧血をひきおこす。また、コバルトは細胞の低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) を活性化することが知られており、細胞の疑似低酸素環境をつくりだすことに用いられている。

ミトコンドリアは好気性分解によって ATP を合成することから、コバルトは単純に神経細胞を障害する他に、神経細胞内のミトコンドリアにも影響を及ぼすと考えた。コバルトによる疑似低酸素環境が、神経細胞内のミトコンドリアにどのような影響を与えるのかを明らかにすることは、将来的に、低酸素や虚血により神経の損傷患者に対するリハビリテーションの一助となると考え、本研究を企画した。

### 2. 研究の目的

(1) コバルトが軸索内の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および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて明らかにする。

(2) 軸索変性の 1 つの指標とされる軸索腫脹の数を計測し、コバルトにより軸索変性が誘発されることを明らかにする。

### 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。

#### (1) 軸索内のミトコンドリアの観察

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。

#### 末梢神経初代培養細胞

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% CO<sub>2</sub>、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、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。

コバルトの影響は、全体で 6-7 週間を経過した培養細胞に、種々の濃度の塩化コバルトを含む培養液 (0 (control)、200µM、400µM、600µM、800µM) に 24 時間暴露し、その後の実験に用いた。

#### 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%、95% air+5% CO<sub>2</sub> の状態で観察した。観察前日に培養液新鮮なものを交換した。データは 6 秒間隔で 200 枚取得した (Before)。その後、それぞれの濃度のコバルトを含む培養液に変え、約 24 時間培養した後に同じコバルトを添加する前に観察した軸索を同定し、同様の条件で観察した。解析はフリーソフト Fiji を用いて、キモグラフ (kymograph) を作製し、輸送ミトコンドリアの割合、停留ミトコンドリアの長さを計測した。

#### 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

800µM のコバルトに 24 時間暴露した初代末梢神経培養細胞をグルタルアルデヒドおよびオスミウムで固定し、脱水、エポン包埋の後に薄切片し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

#### (2) 軸索の腫脹の計測

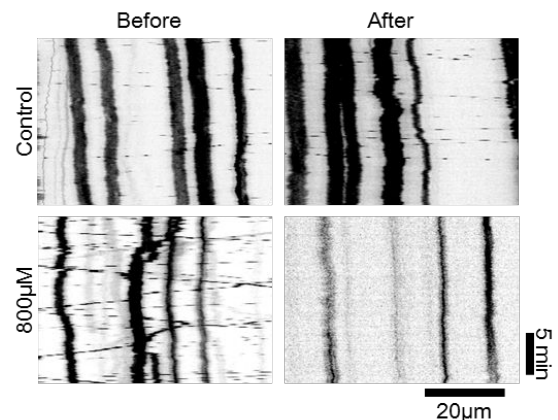
##### 免疫組織化学染色

タイムラプスイメージングに用いたサンプルを 4% パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体に抗 neurofilament protein 抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

染色後、軸索長 100µm あたりの腫脹数を計測した。

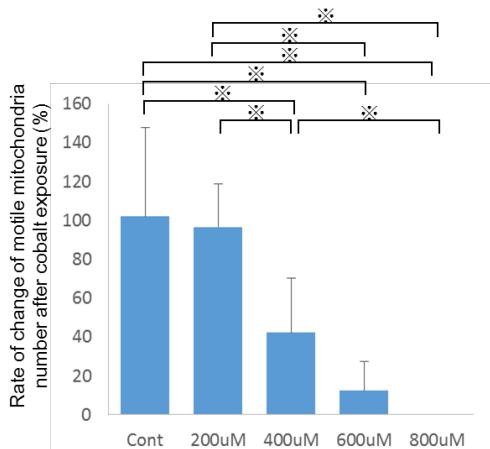
### 4. 研究成果

(1) タイムラプスイメージングによる観察の結果、高濃度のコバルトを添加すると、ミトコンドリアの輸送が抑制された。

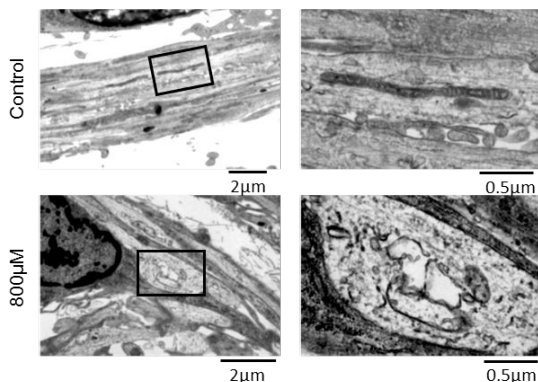


(2) 輸送ミトコンドリアの数は、コバルト濃度が上昇するとともに減少し、800µM のコバ

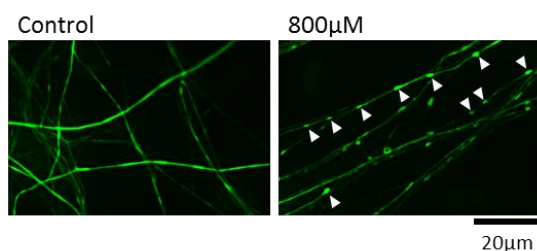
ルト濃度では、ミトコンドリアの輸送が完全に抑制された。



(3)電子顕微鏡による観察では、ミトコンドリアが腫大し、内部構造が破壊されている像が観察された。



(4)高濃度のコバルトは軸索100µmあたりにおける軸索腫脹(白矢頭)の数を増大させた。



以上のことからコバルトはミトコンドリアの正常な機能および形態を障害し、軸索の変性を誘導することが明らかとなった。しかし、コバルトによるこれらの影響はHIFを介したもののなのか、あるいはコバルト自身の毒性によるものなのかはさらなる研究が必要である。

##### 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4件)

Chiang H, Ohno N, Hsieh Y, Mahad DJ, Kikuchi S, Komuro H, Hsieh S, Trapp BD. Mitochondrial Fission Augments

Capsaicin-induced Axonal Degeneration. *Acta Neuropathol.* 129; 81-96, 2015 査読有

Kikuchi S, Ninomiya T, Kawamata T, Tatsumi H. ASIC2 Expression in the Epithelial Cells of Rat Cerebral Ventricle and Choroid Plexus. *J Cytol Histol.* 6; 310, 2015 査読有

Kohno T, Ninomiya T, Kikuchi S, Konno T, Kojima T. Staurosporine induces formation of protrusions composed of actin filaments or microtubules. *Mol Pharmacol.* 87; 815-824, 2015 査読有

Konno T, Ninomiya T, Kohno T, Kikuchi S, Sawada N, Kojima T. c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 enhances barrier function and elongation of human pancreatic cancer cell line HPAC in a Ca-switch model. *Histochem Cell Biol.* 143; 471-479. 2015 査読有

[学会発表](計10件)

二宮孝文, 菊池 真, 小島 隆, 辰巳治之. 末梢神経脱髄過程におけるタイトジャンクションタンパクの局在と微細構造変化. 第119回日本解剖学会総会; 2014.3.27-29:自治医科大学キャンパス. 下野市(栃木県)

辰巳治之, 藤宮峯子, 名越 智, 鈴木大輔, 安宅弘司, 永石歓和, 松村博文, 内山英一, 二宮孝文, 市川量一, 新見隆彦, 菊池 真. サージカルトレーニングの歩み: 現在・そして今後の展望. 第119回日本解剖学会総会; 2014.3.27-29:自治医科大学キャンパス. 下野市(栃木県)

菊池 真, 二宮孝文, 辰巳治之. 低濃度塩化コバルトが軸索内輸送ミトコンドリアに与える影響. 第1回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第4回学術大会合同大会; 2014.11.15-16; 名古屋学院大学名古屋キャンパス白鳥学舎. 名古屋市(愛知県)

Kikuchi S, Ninomiya T, Tatsumi H. Cobalt inhibits the movement of motile mitochondria in the axons. 第120回日本解剖学会総会; 2015.3.21-23. 神戸国際会議場. 神戸市(兵庫県)

Ninomiya T, Kikuchi S, Niikura K, Tatsumi H. Morphological studies on cell membrane permeability of amphiphilic gold nanoparticles in cultured Schwann cells and dorsal root ganglion cells. 第120回日本解剖学会総会; 2015.3.21-23. 神戸国際会議場. 神戸市(兵庫県)

Tatsumi H, Mizoguchi S, Simmi T, Sakaki F, Ninomiya T, Ichikawa R, Kikuchi S, Ohta S. "Info-Medicine": the Center of Innovative Concept Based on an Anatomical View Point. 第120回日本解

剖学会総会；2015.3.21-23.神戸国際会議場．神戸市（兵庫県）

Ando R, Taniguchi K, Kikuchi S, Watanabe K, Fujimiya M, Katayose M, Akima H. Sarcomere length range in vastus intermedius with knee joint rotation. 62nd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (ACSM 2015); 2015.5.26-30; San Diego (USA)

Kikuchi S, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, Tatsumi H. High-density cobalt induces axonal degeneration and inhibits the motility of axonal motile mitochondria. Neuroscience 2015; 2015.1017-21; Chicago (USA)

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; ビッグパレットふくしま. 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; ビッグパレットふくしま. 郡山市（福島県）

〔図書〕(計 1 件)

菊池 真: 第 4 章 神経系. PT・OT 必修シリーズ 消っして忘れない 解剖学要点整理ノート 改訂第 2 版 (井上 馨・松村 讓児編集), 羊土社, 2014 年, 98-143

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 真 (KIKUCHI SHIN)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20404585