

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860129

研究課題名(和文) 有髄軸索の発達と異常におけるミトコンドリア動態変化の分子基盤とその役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and roles of mitochondrial dynamics in development and diseases of myelinated axons

研究代表者

大野 伸彦(OHNO, Nobuhiko)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：10432155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス中枢神経系の発達と髄鞘形成に伴う軸索ミトコンドリアの分布と動態の変化を明らかにした。また髄鞘異形成モデルでは脱髄の進行に伴って、ミトコンドリアの動態変化が脱髄部に特異的に惹起されることを示した。走査型電子顕微鏡による3次元超微形態観察において試料作製過程の改良と新規樹脂開発を行い、関連技術の特許として出願した。またカーボンを主体とした導電性付与剤を応用した導電性樹脂を開発した。この導電性樹脂に脳組織の観察に応用することで、3次元解析におけるチャージングの低減と画質の向上を実現した。成果の一部を複数の論文として発表し、学会においても発表を行った。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated alterations of mitochondrial distribution and dynamics during development of mouse central nervous system. In addition, changes of mitochondrial dynamics were caused specifically in demyelinated segments in the mouse dysmyelination model. In the 3D ultrastructural analyses using scanning electron microscopy, improvement of tissue preparation procedures and development of conductive resins were explored to achieve patent application. The carbon based conductive resin could reduce charging and improve imaging in the 3D ultrastructural analyses. The obtained results were published as several papers and presented in conferences.

研究分野：解剖学

キーワード：Mitochondria Myelination Demyelination Electron microscopy Conductive resin

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはエネルギー産生などの細胞の代謝に重要な役割を果たし、またその機能維持には、動きや局在、分裂と融合などのダイナミクス(動態)の制御が必要である。また髄鞘は速い跳躍伝導を可能にし、神経伝達に必要な軸索のエネルギー消費を減らしている。当時の研究の進歩により、有髄軸索と無髄軸索の代謝は大きく異なり、また髄鞘の機能異常は統合失調症などの精神神経疾患を含む、幅広い病態に関与していると考えられていた。しかし有髄軸索におけるミトコンドリアの動態・機能の制御と役割には不明な点が多く、軸索内ミトコンドリアの動態が、疾病における有髄軸索の機能や生存、さらには正常な有髄軸索の発達と維持において果たす役割にはよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

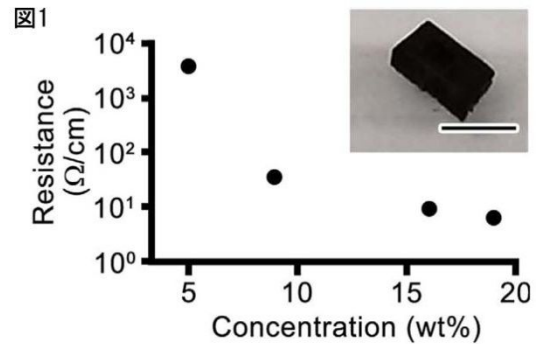
本研究では発達における(a)髄鞘の形成と(b)遺伝性の髄鞘障害(髄鞘形成不全)に焦点を絞り、有髄軸索におけるミトコンドリア動態や機能の変化とその役割を明らかにすることを目指した。そしてそのため、髄鞘の形成における、軸索内ミトコンドリアの動態の役割を解明すること、そして髄鞘形成不全における軸索内ミトコンドリアの動態変化とその制御の治療的意義を検討すること、という2つの目的を設定した。

3. 研究の方法

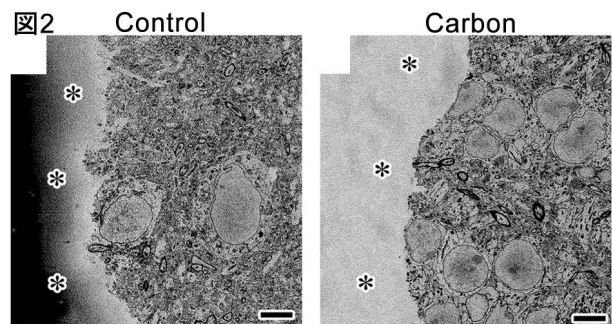
有髄軸索の発達と疾病におけるミトコンドリアの動態変化、そしてその機序と役割を明らかにする。そのため、(i)ミトコンドリアの動態変化の3次元超微形態解析やライブイメージング、(ii)ミトコンドリア融合・分裂関連蛋白の生化学的解析、あるいは(iii)遺伝子導入などによるミトコンドリア動態の改変の影響の解析などの多面的なアプローチを、(1)髄鞘形成、および(2)髄鞘形成不全のそれぞれに用いることで、研究を進めた。

4. 研究の成果

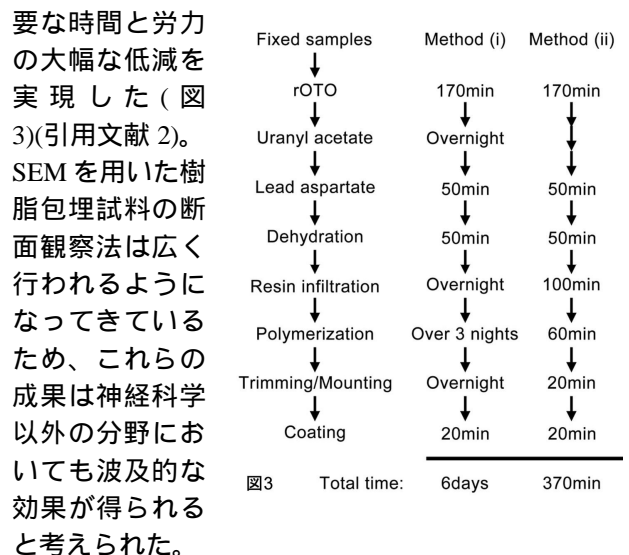
本研究では軸索内のミトコンドリアの変化を詳細に観察するために、走査型電子顕微鏡(SEM)による連続断面観察法を用いた。しかし生物組織は元々導電性が低いため、試料のチャージングがデータの質を低下させてしまう問題点があった。こうした問題に対する解決法の一つとして、我々は試料の包埋に用いられる樹脂の導電性を高めるため、樹脂にカーボン(Ketjen black)を混合することで、濃度依存性に樹脂の電気抵抗値を大きく低下させた(図1)(引用文献1)。このカーボンを含む導電性樹脂は主に試料の周



囲を取り囲むように分布しており、試料の内部には浸透しなかった。しかし Serial block-face SEM (SBF-SEM)によるイメージングにおいて試料周囲のチャージングを大きく改善した(図2)。



また安定した試料の切削に寄与することで、得られる画像の解像度が改善することもわかった。また効率的に神経組織の観察を進めるため、試料作製過程の改良を行った。その結果、試料作製過程に必要な時間と労力の大幅な低減を実現した(図3)(引用文献2)。



と考えられた。本研究ではこうした新たな手法も応用しながら、マウス脳組織の有髄神経線維の3次元超微形態解析を行った。その結果、正常な髄鞘の形成と軸索径の増大に伴って個々の軸索ミトコンドリア(Mito)の径と長さの増加によるMito総体積の有意な増加が認められた。一方、PLPtgマウスでは、無髄軸索においては個々のMitoの体積は野生型と相違はないものの、その密度と総体積が野生型に比較して大きく増加し

ていた。1 ヶ月齢における髄鞘の形成に伴って、PLPtg マウスの Mito の体積、密度は野生型とほぼ同様に变化したが、3 ヶ月齢での脱髄に伴って、脱髄軸索においては、Mito の密度と総体積の増加が認められた。これらの結果から、正常な髄鞘の形成・軸索径の増加と、Mito の融合・総体積増加に強い相関があることが示唆された。また PLP-tg では無髄軸索において既に Mito の分布変化が引き起こされること、また脱髄に伴って Mito の断片化と腫大、もしくは局在変化が関連する可能性が示唆された。正常マウス脳組織における生化学的解析においては、発達に伴う Mito 動態関連蛋白の発現の明らかな変化は認められなかった。一方、PLPtg マウス脳組織では、1 ヶ月齢において分裂や呼吸機能に関わる分子については明らかな変化を認めなかったが、5 ヶ月齢において分裂関連分子の発現の減少が認められた。スライス培養系を用いた解析では、既に報告されているように顕著な髄鞘の形成が正常マウスで認められるが、PLPtg マウスより作製したスライスでは、一過性に髄鞘の形成が認められた後、脱髄が進行し、生体内と同様の変化が観察されることがわかった。また、脱髄に伴って、生体内で観察されたものと同様のミトコンドリアの分布の増加が観察された。

<引用文献>

- (1) Nguyen HB, Thai TQ, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Fujitani H, Otobe H, **Ohno N**. Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging. *Sci Rep*. (2016) 6:23721.
- (2) Thai TQ, Nguyen HB, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Elewa YH, Ichii O, Kon Y, Takaki T, Joh K, **Ohno N**. Rapid specimen preparation to improve the throughput of electron microscopic volume imaging for three-dimensional analyses of subcellular ultrastructures with serial block-face scanning electron microscopy. *Med Mol Morphol*. (2016) In press.

5. 主な発表論文等

<雑誌論文> 10 報

- (1) Nguyen HB, Thai TQ, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Fujitani H, Otobe H, **Ohno N**. Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging. *Sci Rep*. (2016) 6:23721. doi: 10.1038/srep23721. (査読あり)
- (2) Thai TQ, Nguyen HB, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Elewa YH, Ichii O, Kon Y, Takaki T, Joh K, **Ohno N**. Rapid specimen preparation to improve the throughput of electron microscopic volume imaging for three-dimensional analyses of subcellular ultrastructures with serial block-face scanning electron microscopy. *Med Mol Morphol*. (2016) In press. PMID:26867664. (査読あり)
- (3) **Ohno N**, Katoh M, Saitoh Y, Saitoh S. Recent advancement in the challenges to connectomics. *Microscopy*. (2016) 65:97-107. doi: 10.1093/jmicro/dfv371. (査読あり)
- (4) Terada N, Saitoh Y, Kamijo A, Ohno S, **Ohno N**. Involvement of membrane skeletal molecules in the Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells. *Med Mol Morphol*. (2016) 49:5-10. doi: 10.1007/s00795-015-0125-0. (査読なし)
- (5) **大野伸彦**. SSSEM による脳組織の 3 次元再構築. *Clinical Neuroscience*. (2016) 34 368-9. (査読なし)
- (6) Chiang H, **Ohno N**, Hsieh YL, Mahad DJ, Kikuchi S, Komuro H, Hsieh ST, Trapp BD. Mitochondrial fission augments capsaicin-induced axonal degeneration. *Acta Neuropathol*. (2015) 129:81-96. doi: 10.1007/s00401-014-1354-3. (査読あり)
- (7) **Ohno N**, Katoh M, Saitoh Y, Saitoh S, Ohno S. Three-dimensional volume imaging with electron microscopy toward connectome. *Microscopy*. (2015) 64:17-26. doi: 10.1093/jmicro/dfu112. (Editor of the special issue "Challenges to Connectomics"). (査読あり)
- (8) **大野伸彦**, 齊藤成, 齊藤百合花, 大野伸一. SBF-SEM による生体内 3 次元微細構造観察の試料作製とその応用. *顕微鏡*. (2014) 49:166-170. (査読あり)
- (9) **Ohno N**, Chiang H, Mahad DJ, Kidd GJ, Liu L, Ransohoff RM, Sheng ZH, Komuro H, Trapp BD. Mitochondrial immobilization mediated by syntaphilin facilitates survival of demyelinated axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2014) 111:9953-8. doi: 10.1073/pnas.1401155111. (査読あり)
- (10) Yamasaki R*, Lu H*, Butovsky O*, **Ohno N**, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J,

Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* (2014) 211:1533-49. doi: 10.1084/jem.20132477. (*: equal contribution) (査読あり)

<学会発表> 8件

- (1) **大野伸彦**. 試料作製法の進歩が拓く SEM 連続断面観察法の展望. 第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会. (2016 年 3 月 28 日 ~ 30 日、ビックパレット福島、福島県郡山市)
- (2) **Ohno N**, Otobe H, Fujitani H. Development of conductive resin to facilitate 3D ultrastructural imaging in life science. The 2nd. East-Asia Microscopy Conference, EAMC2. Young Scientists Satellite Meeting. (2015 年 11 月 27 ~ 28 日、淡路夢舞台、兵庫県淡路市)
- (3) **大野伸彦**、乙部博英、藤谷洋. SEM 断面観察法をより簡便にする試料作製法の進歩. 第 47 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. (2015 年 9 月 18 ~ 19 日、長崎大学、長崎県長崎市)
- (4) Katoh M, Wu B, Nguyen HB, Thai TQ, Sakoh T, Saitoh Y, Saitoh S, Shinozaki Y, Koizumi S, **Ohno N**. Mitochondrial fission and elongation in microglia induced by activation with LPS. 第 58 回日本神経化学会. (2015 年 9 月 11 ~ 13 日、大宮ソニックシティ、埼玉県さいたま市)
- (5) **大野伸彦**. Mechanisms and roles of mitochondrial dynamics in physiology and pathology of myelinated axons. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会. (2015 年 3 月 23 ~ 26 日、神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)
- (6) **大野伸彦**、齊藤成、齊藤百合花、井上朋大、加藤良平、大野伸一. SBF-SEM の応用による疾病モデルおよびヒト組織の 3 次元微細構造観察. 第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. (2014 年 10 月 18 ~ 19 日、TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター、東京都新宿区)
- (7) **大野伸彦**. 末梢神経軸索障害におけるミトコンドリア動態の役割. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会

合同年会. (2014 年 9 月 29 日、奈良県文化会館、奈良県奈良市)

- (8) **大野伸彦**. 髄鞘の異常におけるオルガネラ動態の変化. 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. (2014 年 9 月 28 日、松本市中央公民館、長野県松本市)

<産業財産権>

○出願状況 (計 1 件)

名称: 形態観察用試料の調製方法及びそれに用いる液体処理用器具、試料台

発明者: **大野伸彦**、乙部博英、藤谷洋

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-177235

出願年月日: 平成 27 年 9 月 9 日

国内外別: 国内

<その他>

ホームページ等

<http://researchmap.jp/ohnoccf/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 伸彦 (OHNO, Nobuhiko)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 1 0 4 3 2 1 5 5