

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430036

研究課題名(和文) 損傷神経軸索内ミトコンドリアの品質管理のメカニズム

研究課題名(英文) Nerve injury-induced mitochondrial fission is involved in the maintenance of mitochondrial and axonal integrity

研究代表者

桐生 寿美子(瀬尾寿美子)(Kiryu-Seo, Sumiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70311529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：損傷神経細胞の生存・再生には多くのエネルギーが必要される。神経損傷後エネルギー供給源であるミトコンドリアの機能を維持するためミトコンドリアダイナミクス制御が重要であると考えられたが詳細は不明であった。本研究課題では、神経損傷初期よりミトコンドリア分裂が亢進すること、ミトコンドリア分裂は細胞死・軸索変性へ至る過程を示すのではなく神経損傷という緊急状態に適応しミトコンドリアの品質を保持するための応答反応であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Regenerating neurons are assumed to control mitochondrial dynamics properly to satisfy a huge energy demand and to maintain Ca²⁺ buffering. However, it is unclear how mitochondrial dynamics contributes to axonal and neuronal integrity in damaged neurons in vivo. We have found that short mitochondria are actively transported in regenerating motor nerves soon after nerve injury. The mice in which mitochondrial fission is ablated specifically in injured motor neurons have clarified that short mitochondria are divided mitochondria. Our study has demonstrated that acute and prominent mitochondrial fission is a crucial response during the early stage after nerve injury and is involved in the maintenance of mitochondrial and axonal integrity to prevent neurodegeneration.

研究分野：神経再生修復

キーワード：ミトコンドリア 神経再生 運動ニューロン Drp1 ミトコンドリア分裂 神経変性 軸索 ATF3

1. 研究開始当初の背景

外傷や神経変性疾患によりダメージを受けた神経細胞を守るメカニズムの解明は再生医療を目指す上で極めて重要な課題である。私達はこれまで損傷運動ニューロンの再生・修復の分子メカニズム解明を目指して研究を進めてきた。神経細胞が損傷に対し耐性を有し生存・再生するためには莫大なエネルギーが必要とされる。こうしたエネルギー供給源として細胞内小器官であるミトコンドリアは極めて重要な役割を果たしていると考えられる。これまで我々はミトコンドリア機能が損傷運動ニューロンの生死の運命決定に極めて重要であることを明らかにしてきた。近年、ミトコンドリア機能はミトコンドリアダイナミクスにより巧妙に制御されていることが次第に明らかになってきている。様々な神経変性モデルマウスでは軸索変性に先駆けて軸索内でミトコンドリアが過剰に蓄積・断片化する等の異常が観察される。これはミトコンドリアダイナミクスの制御異常が原因と考えられる。従って神経損傷に対して耐性を獲得するためには、適切にミトコンドリアダイナミクスが制御される必要があると推測された。しかし、研究開始当時にはそのような研究はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは細胞内外刺激に素早く応答し融合・分裂を介して形態変化を繰り返す。神経細胞特有の形態である軸索では、エネルギー供給源であるミトコンドリアの輸送システムが独自に発達している。このようなミトコンドリアダイナミクスが適切に制御されることで細胞内ホメオスタシスは維持されていると考えられる。ミトコンドリアダイナミクス制御の仕組みはこれまで主に培養細胞を用いた *in vitro* で研究されてきており、*in vivo* での研究はほとんど行われていなかった。しかし今後再生医療や予防医学を推進するためには *in vivo* でダメージを受けた神経細胞内ミトコンドリアダイナミクスの意義を明らかにしていく必要がある。そこで我々は独自に作製した損傷神経細胞特異的にミトコンドリアが標識され同時に *cre* リコンビナーゼが発現誘導されるユニークなマウスを用いて *in vivo*

損傷神経でのミトコンドリアダイナミクスを明らかにし、ミトコンドリア品質維持と神経再生・変性との関連を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス

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 標識し同時に *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ミトコンドリア分裂が抑制される *Drp1 CK0* マウス (*Atf3:BAC Tg* マウスと *Drp1 flox* マウスを交配) を用いた。*Drp1 flox* マウスは九州大学三原先生、野村先生、久留米大学石原先生より供与していただいた。

(2) 神経損傷モデル作製

末梢神経損傷モデルである舌下神経、坐骨神経損傷モデルと中枢神経損傷モデルである視神経損傷モデルを作製した。

(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化学を行った。損傷神経内のミトコンドリア形態を評価する際は切片を作製せずに軸索をホールマウントで染色しミトコンドリアの全体像が保持されるようにした。

(4) ウェスタンブロット

マウス神経損傷後の脊髄前角、舌下神経核を切り出し、蛋白を抽出しウェスタンブロットを行った。

(5) 軸索ミトコンドリアの *in vivo* ライブイメージング

損傷軸索でミトコンドリアの移動速度を評価するため、マウス坐骨神経損傷数日後に麻酔下で皮膚を切開しダメージを与えないよう坐骨神経を剖出し *FV10i* (オリンパス) で 5 秒間隔で坐骨神経内 GFP 標識ミトコンドリアの *in vivo* イメージングを行った。得られたイメージは *image J* などのソフトウェアで解析した。

坐骨神経内のミトコンドリアの膜電位測定のため、麻酔でマウス坐骨神経を剖出しミトコンドリア膜電位感受性色素を 30 分間添

加し PBS にて洗浄後、顕微鏡下 (FV10i) で坐骨神経内ミトコンドリアのライブイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 神経損傷後のミトコンドリア形態変化

① 神経損傷応答マウス (Atf3:BAC Tg) の利用
坐骨神経損傷後のミトコンドリアの形態変化を明らかにするため、損傷神経細胞特異的にミトコンドリアが GFP 標識され同時に cre リコンビナーゼが発現する Atf3:BAC Tg マウスを用いた。このマウスは野性型マウスと同等であるが、損傷を受けたニューロンと健全なニューロンとを容易に区別し、損傷ニューロン内ミトコンドリアとグリア細胞など周囲細胞のミトコンドリアとを明確に区別することが可能である。

② 神経損傷に応答した軸索ミトコンドリアの形態変化

Atf3:BAC Tg マウス坐骨神経損傷後 24~36 時間目の損傷軸索では、損傷前から軸索に局在していたと考えられる GFP 標識されないミトコンドリアと、損傷後細胞体で GFP 標識され軸索輸送されるミトコンドリアとが混在していた。損傷前から軸索に局在すると考えられる GFP 陰性ミトコンドリアの径は比較的長いのに対し、GFP 陽性ミトコンドリアの径は短かった。様々な神経再生関連遺伝子の発現がピークを迎える 3-7 日目には、軸索内の全てのミトコンドリアが GFP 陽性となり径の短いミトコンドリアの出現頻度が上昇した。径の短いミトコンドリアはその後神経再生に伴って元の長さに戻った。

神経損傷後径の短いミトコンドリアが増加することから、損傷運動ニューロンではミトコンドリアが盛んに分裂している可能性が示唆された。一般にダメージを受けた神経細胞でのミトコンドリア分裂は神経変性へ至る過程の反応と考えられている。しかし、神経損傷初期の運動ニューロン軸索で亢進するミトコンドリア分裂は、損傷という特殊な状況下で神経再生へ向けて軸索末端まで大量のエネルギーを効率よく供給するための適応反応ではないかと考えられた。

(2) 損傷運動ニューロン内のミトコンドリア分裂の意義

① 神経損傷に応答する Drp1 CKO マウス
損傷運動ニューロン特異的にミトコンドリア分裂因子 Drp1 がノックアウトされるよう、Atf3:BAC Tg マウスと Drp1 flox マウスとを交配し Drp1 CKO マウスを得た (図 1 A)。Drp1 CKO マウスでは神経損傷に応答して損傷運動ニューロン内のミトコンドリア分裂が阻害される。

坐骨神経損傷後 7 日目、Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロンの細胞生存率は 100% 保たれていた。そこで損傷後 7 日目までの時間経過で、Atf3:BAC Tg マウスと Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロン内でのミトコンドリア形態および機能を以下の②および③の実験で比較検討した。

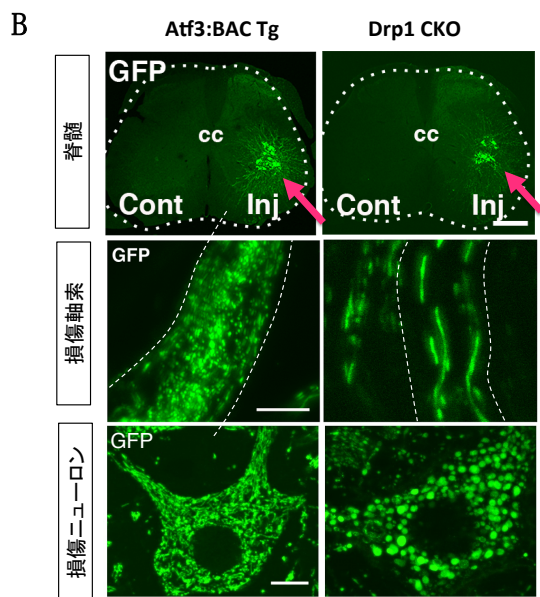
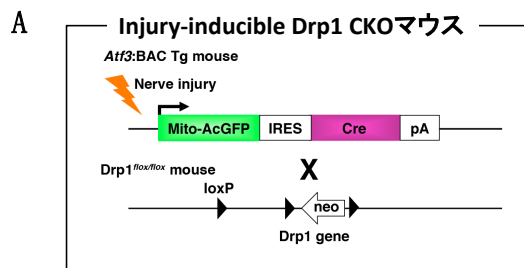


図 1 損傷運動ニューロン特異的ミトコンドリア分裂阻害マウス

A: Atf3:BAC Tg マウスと Drp1 flox マウスとの交配で Drp1 CKO マウスは得られる。B: 坐骨神経損傷後の GFP 陽性反応。坐骨神経損傷後、損傷側の脊髄前角運動ニューロンは GFP 陽性反応 (ピンクの矢印) を示す (上のパネル)。損傷軸索 (中央のパネル) および損傷運動ニューロン細胞体 (下のパネル) の強拡大写真では、GFP 標識されたミトコンドリアの形態変化が明らかに観察される。

② Drp1 CKO マウス損傷軸索内ミトコンドリアの形態と機能

野性型マウス坐骨神経損傷軸索ではミトコンドリアの径が短くなるのが(1)~②で示された。このような短い径のミトコンドリアは、ミトコンドリアが分裂あるいは縮小した結果と考えられる。いずれであるかを明らかにするため Drp1 CKO マウスの坐骨神経を損傷したところ、軸索内ミトコンドリアの径は Atf3:BAC Tg マウスに比べ有意に長くなるのが明らかになった(図1B)。従って神経損傷後にはミトコンドリア分裂が亢進し、このため損傷軸索で径の短いミトコンドリアが顕著に増加することが明らかになった。

次にミトコンドリア形態変化に伴うミトコンドリア機能の変化を明らかにするため、坐骨神経軸索内ミトコンドリアを *in vivo* ライブイメージングで可視化し、Atf3:BAC Tg マウスおよび Drp1 CKO マウス軸索でのミトコンドリア軸索輸送スピードおよびミトコンドリア膜電位を比較検討した。その結果、いずれのマウスも神経損傷後3日目にはミトコンドリア軸索輸送スピードが健常側に比べ顕著に上昇することが明らかになった。損傷後7日目では Atf3:BAC Tg マウスに比べ Drp1 CKO マウスで観察される径の長いミトコンドリアの軸索輸送スピードは著しく低下した。さらに、坐骨神経軸索内のミトコンドリア膜電位を調べたところ、損傷後3日目では両マウス間で相違は認められなかった。しかし、損傷後7日目になると Drp1 CKO マウス損傷軸索内ミトコンドリアの膜電位は顕著に低下した。

③ Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロン細胞体でのミトコンドリア

坐骨神経損傷後7日目、Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロン細胞体では丸く巨大な異常な形態のミトコンドリアが観察された。Atf3:BAC Tg マウスではそのような異常な形態を示すミトコンドリアは全く観察されなかった(図1B)。Drp1 欠損損傷運動ニューロン細胞体の巨大ミトコンドリアはミトコンドリア膜電位消失のマーカーである Parkin と共染色された。また、一部の巨大ミトコンドリアではオートファジーマーカーである p62 との共染色像が確認された。

加えて、明らかなミトコンドリア形態異常

が観察されない損傷早期3日目であっても Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロン周囲のミクログリアは Atf3:BAC Tg マウス損傷運動ニューロン周囲のミクログリアに比べて著しく活性化していた。

(3) ミトコンドリア分裂が阻害された損傷運動ニューロンおよび損傷軸索の運命
坐骨神経損傷後14日目 Atf3:BAC Tg マウス損傷運動ニューロンは100%生存している。しかし Drp1 CKO マウス損傷運動ニューロンの大部分は細胞死へ至ることが明らかになった。Drp1 CKO マウス損傷軸索でも明らかな軸索変性像が認められた。従って神経損傷後のミトコンドリア分裂は損傷運動ニューロンが生存・再生するために必要な反応と考えられた。しかし神経損傷とは無関係にミトコンドリア分裂阻害が原因でミトコンドリア機能が低下し運動ニューロンの細胞死・軸索変性が惹起された可能性も否定できない。そこで神経損傷を加えない Drp1 flox マウス運動ニューロンに cre リコンビナーゼを組み込んだアデノウイルスを感染させ Drp1 をノックアウトし、損傷を加えない運動ニューロンでの細胞生存率を検討した。その結果ウイルス感染後14日経っても運動ニューロンの細胞死は全く認められなかった。

以上の結果より、神経損傷初期のミトコンドリア分裂促進は、不良ミトコンドリアを細胞体で処理し健康なミトコンドリアを素早く軸索や軸索末端に輸送し十分なエネルギーを供給するための適応反応と考えられた。さらに神経損傷にตอบสนองして一過性に傾いたミトコンドリア分裂・融合のバランスが元に戻ることも神経再生には重要であることが示唆された。従ってミトコンドリア分裂は細胞死へ至る過程の反応というよりむしろ、神経損傷にตอบสนองして運動ニューロン内ミトコンドリア品質を維持しホメオスタシスを維持するための防御反応と考えられた。こうした巧妙なミトコンドリア分裂・融合のバランス制御機構が破綻し、ミトコンドリア分裂活性が亢進した状態が続くことで神経細胞死や軸索変性に至るのではないかと考えられた。

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)

- ① Matsumoto S, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Motor nerve arborization requires proteolytic domain of Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) during development. *J Neurosci*, 36, 4744-4757, 2016. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3811-15.2016. 査読有
- ② Nagata K, Kiryu-Seo S, Tamada H, Okuyama-Uchimura F, Kiyama H, Saido TC. ECEL1 mutation implicates impaired axonal arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogryposis. *Acta Neuropathol*, in press, 2016. 査読有
- ③ Yin X, Kiryu-Seo S, Kidd GJ, Feltri ML, Wrabetz L, Trapp BD. Proteolipid protein cannot replace P0 protein as the major structural protein of peripheral nervous system myelin. *Glia*, 63, 66-77, 2015, 2014. doi: 10.1002/glia.22733. Epub 2014 Jul 28. 査読有
- ④ Nagata K, Hama I, Kiryu-Seo S, Kiyama H. microRNA-124 is down regulated in nerve-injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3. *Neuroscience*, 526, 426-432, 2014. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.055. Epub 2013 Oct 31. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, The mitochondrial dynamics after motor neuronal injury. ISN2015 (Cains, Australia) 2015.8.25.
- ② 松本早紀子、桐生寿美子、木山博資、「DINE のプロテアーゼ活性は運動ニューロン軸索終末分枝及び神経筋接合部の形成に不可欠である」第 120 回日本解剖学会総会、第 92 回日本生理学会大会 (神戸コンベンションセンター、兵庫県・神戸市) 2015.3.22

- ③ 桐生寿美子、木山博資「Mitochondrial dynamics in damaged neurons」神経再生・変性に関わるミトコンドリアダイナミクス、第 120 回日本解剖学会総会、第 92 回日本生理学会大会 (神戸コンベンションセンター、兵庫県・神戸市)、2015.3.21
- ④ 桐生寿美子、木山博資、「損傷に応答するミトコンドリア」、第 57 回日本神経化学大会 (奈良県分化会館、奈良県・奈良市) 2014.9.29
- ⑤ 松本早紀子、桐生寿美子、木山博資、「DINE のプロテアーゼ活性は脊髄運動ニューロン軸索終末分枝及び神経筋接合部形成に必須である」第 57 回日本神経化学大会 (奈良県分化会館、奈良県、奈良市) 2014.9.29
- ⑥ Sakiko Matsumoto, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, Enzymatic activity of Damage-induced neuronal endopeptidase/Endothelin-converting enzyme-like 1 (DINE/ECEL1) is crucial for neuromuscular junction formation during development. *Neuroscience* 2014 (Washington DC, USA) 2014.11.16
- ⑦ Sumiko Kiryu-Seo, Hiromi Tamada, Yukina Kato, Naotada Ishihara, Masatoshi Nomura, Katsuyoshi Mihara, Hiroshi Kiyama, Nerve injury-induced mitochondrial fission is an essential adaptive response to maintain neuronal survival and promote axonal regeneration. *Neuroscience* 2014 (Washington DC, USA) 2014.11.18
- ⑧ Sakiko Matsumoto, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama. The protease activity of DINE/ECEL1 is required for the motor nerve terminal arborization and the neuromuscular junction formation, 6th special conference of the international society for neurochemistry (Tokyo University, 東京都文京区) 2014.9.21
- ⑨ 松本早紀子、桐生寿美子、木山博資、脊髄運動ニューロンの軸索最終分枝及び神

経筋接合部形成には DINE のプロテアーゼ活性が必要である第 119 回日本解剖学会 (自治医大、栃木県・下野市) 2014.3.29

- ⑩ 桐生寿美子、木山博資、「神経損傷とミトコンドリアダイナミクス」脳内環境冬の班会議 (広島大学広仁会館、広島県・広島市)、2014.1.8
- ⑪ 桐生寿美子、木山博資、「神経再生・変性に関わるミトコンドリアダイナミクス」脳内環境夏の班会議 (京都大学紫欄会館・京都府・京都市) 2013.8.29
- ⑫ 木山博資、桐生寿美子、松本早紀子、「運動神経軸索再生とプロテアーゼ」第 24 回日本末梢神経学会学術集会 (新潟コンベンションセンター、新潟県・新潟市) 2013.8.24
- ⑬ 桐生寿美子、松本早紀子、木山博資、「軸索に存在する DINE はシュワン細胞と相互作用することにより適切な軸索ブランチングおよび神経筋接合部形成を促す」Neuro2013 (国立京都国際会館、京都府・京都市) 2013.6.22
- ⑭ 永田健一、桐生寿美子、斉藤貴志、木山博資、西道隆臣、「DINE 欠損運動神経の骨格筋支配の発生的異常」Neuro2013 (国立京都国際会館、京都府・京都市) 2013.6.22,

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Anatomy2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐生 寿美子 (瀬尾 寿美子)

(KIRYU-SEO, SUMIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70311529