

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05117

研究課題名(和文) 損傷神経の運命決定におけるオルガネラダイナミクス

研究課題名(英文) Organelle dynamics for fate determination of injured neurons

研究代表者

木山 博資 (Kiyama, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00192021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,190,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オルガネラ動態と損傷神経の運命の関係を明らかにし、その動態を決定する分子機序に迫ることをめざした。神経損傷特異的なプロモーター下でミトコンドリア(Mt)を標識し、かつCre蛋白を発現するトランスジェニック動物(TG)を用い損傷神経内のMt等の動態を明らかにした。軸索損傷により、軸索内のMtは分裂小型化し、速い速度で移動した。再生軸索先端へより多くのMtを輸送するためと考えられる。Mtの分裂を担っているDrp1分子を損傷運動神経特異的にノックアウトすると、Mtには多様な変調が生じ細胞死が加速した。Mtの分裂能は神経細胞の生存に必要な応答であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動神経損傷後に生じるオルガネラ動態の変化が、損傷神経細胞の生存や再生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。特にミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すことで機能を維持しているが、分裂の欠損により神経損傷に対する耐性が失われることが明らかになった。これらの結果は、オルガネラ動態の異常に起因する神経変性疾患の変性メカニズムの解明に繋がることが予想され、これら疾患の治療法開発への貢献が期待される。本研究の成果は、神経変性疾患以外にも外傷後の運動神経再生や神経障害性疼痛の治療法開発にも新たな知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have investigated significances of organelle dynamics which are observed in response to nerve injury. We used the BAC transgenic mice, which express mitochondria labelling GFP and Cre recombinase protein simultaneously and specifically in nerve injured neurons in response to nerve injury. After nerve injury the mitochondria in injured nerve became smaller and moved quicker, although the mitochondrial size in cell soma was not changed. This morphological alteration of mitochondria would be important for delivering mitochondria to regenerating nerve tip. The deletion of Dpr1, which is a responsible molecule for the mitochondrial fission, induced mitochondrial enlargement, and the Drp1 deleted motor neurons died quickly in response to nerve injury.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ミトコンドリア 神経損傷 軸索再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経筋疾患における著しい QOL の低下を引き起こすものに、神経損傷による運動障害と難治性の疼痛がある。損傷神経の修復による運動機能の修復や神経障害性疼痛からの開放に至る研究は、QOL の観点から社会的にも重要な課題である。これまでに、我々は損傷神経の温存再生へ向けて以下のような基礎研究を積み上げてきた。1992 年頃より各種の末梢神経損傷モデルを試み、分子生物学的あるいは形態学的解析の発展性を考慮し舌下神経の損傷モデルに至った。そのモデル系を用いて(i)トランスクリプトーム解析、(ii)損傷神経核特異的 cDNA ライブラリーの作成、(iii) プロテオミクス解析、(iv) G 蛋白共役型受容体 (GPCR) のスクリーニングを行い、軸索損傷時に発現する多くの遺伝子群の機能を遺伝子改変動物やウイルスベクターを用い *in vivo* で解析し新たな機能を明らかにした。

我々の遺伝子スクリーニングによって得られた遺伝子のなかに、損傷神経に特異的に発現するメタロプロテアーゼがあり、Damage induced neuronal endopeptidase (*DINE*)と命名した (PNAS2000)。次に、*DINE* プロモーター領域を解析し、その転写因子群を同定した所、神経損傷特異的に発現上昇する遺伝子群に共通の転写因子集団があること、それらの転写因子は多様な組み合わせで複合体を形成することにより、高い損傷神経特異性を持って遺伝子を発現していることが明らかになった。特に、この複合体の中に ATF3 という転写因子が含まれることが、神経特異的発現や障害応答性を引き出す鍵となることが明らかになった。転写因子 ATF3 は通常脳内にはほとんど発現していないが、中枢末梢にかかわらず、神経軸索が損傷するとその mRNA の発現が強く誘導され、きわめて損傷特異的に神経細胞でのみ発現することが明らかになった。我々はこの ATF3 のプロモーターを利用したトランスジェニックマウス(TG)の開発を以前より試みていたが、最近漸く神経損傷特異的にミトコンドリアを蛍光蛋白の AcGFP で標識すると同時に Cre リコンビナーゼを発現する BAC TG を得ることに成功した。これにより神経損傷から再生あるいは変性にいたる過程でミトコンドリアのダイナミクスをライブで可視化できるようになった。この TG マウスを用いることにより、神経損傷後の各種オルガネラの動態を追跡し、同時に Cre を用いて特定の分子を損傷神経特異的にノックアウトすることが可能になった。

### 2. 研究の目的

損傷神経の再生におけるミクロ (分子レベル) とマクロ (細胞間相互作用) の動態の解析は進んだが、その中間に位置する、オルガネラレベルでの研究がミッシングリンクとなっている。実際、損傷神経内のオルガネラは細胞の状態に応答してダイナミックに変動し、神経細胞の運命とオルガネラの動態には何らかの相関があることが予想される。細胞が外界からのストレスや損傷を受けた時に、細胞を守るための応答が引き起こされる。この時にオルガネラの形態や構成分子の変化が見られるが、その意義はほとんど解明されていない。本研究では、上述の ATF3-TG マウスを用いて神経損傷後のミトコンドリアダイナミクス (分裂・融合・軸索輸送) を観察するとともに、ミトコンドリアダイナミクスに関与する分子 (mitofusin, Drp1 等) を損傷神経特異的にノックアウトしその意義を明らかにする。同様に他のオルガネラの動態とその分子メカニズムについても解析する。さらにミトコンドリアとリソゾームがインターアクションするマイトファジーのように複数のオルガネラ間のインターアクションを可視化・解析することもめざす。

### 3. 研究の方法

本研究では、最近我々の教室で作製されたトランスジェニックマウスの特長を生かし、神経細胞が損傷を受けてから再生あるいは細胞死に至る過程で細胞内のオルガネラがどのように動くかを個体レベルでトレースし、その機能意義を明らかにすることをめざしている。最近完成したトランスジェニックマウスでは、神経損傷特異的に神経細胞でのみ発現する転写因子 ATF3 のプロモーターを利用し、ATF3 プロモーター下で Cre とミトコンドリアを標識する Mito-AcGFP を同時に発現する。このトランスジェニックマウス [tg (ATF3-Cre/mito-GFP)] では、Cre と Mito-AcGFP は正常な脳内ではほとんど発現していないが、中枢・末梢に関わらず神経損傷が起こった時には、損傷を受けた神経細胞でのみ Cre が発現し、同時にミトコンドリアが GFP 標識される。このようなトランスジェニックマウスは我々が長らく作製を試み、ようやく完成したもので、類似のものは存在せず、本提案研究の高い独創性と独自性を担保している。また、オルガネラ構造を 3 次元で観察するため収束イオンビーム / 走査電顕 (FIB/SEM) を用い、従来得られなかった微細構造変化の同定をめざした。一連の実験に関する遺伝子組換えや動物実験計画などは全て名古屋大学医学系研究科委員会での承認を得た。

### 4. 研究成果

#### (1) 損傷神経におけるミトコンドリアダイナミクスの解析

[tg (ATF3-Cre/mito-GFP)] マウス (ATF3-Cre TG マウス) の脳内ではミトコンドリアが GFP 標識された細胞はほとんど見られないが、坐骨神経や舌下神経を損傷した場合には、損傷した神経細胞に限局し、ミトコンドリアが GFP 標識された。ミトコンドリアは樹状突起の先から軸索の先端まで幅広く局在しており、個々の損傷ニューロンの全体を可視化することが可能になった。坐骨神経損傷時に標識された損傷軸索内のミトコンドリアの形態を解析したところ、ミトコン

ドリアのサイズ(長さ)は優位に低下し小型のものが多くなった。また、in vivo タイムラプスによりミトコンドリアの移動速度を計測すると、移動速度は明らかに速くなっていた。このことから、軸索が損傷した場合、軸索内のミトコンドリアは fission により小型化し、早い速度で移動していることが明らかになった。これは、軸索再生を促進するためにミトコンドリアを小型化し、再生軸索先端へより多くのミトコンドリアを速く送り込む仕組みが作動していると考えられる。一方、損傷神経の細胞体では、このようなミトコンドリアの小型化は見られなかった。

#### (2) Cre 発現を利用した損傷特異的特定分子ノックアウト

上述の結果は、ミトコンドリアの fission が神経再生に関わっていることを示唆しているが、fission の重要性を検証するため、ATF3-Cre TG マウスと fission の責任分子の DRP1 の Flox マウスを交配し、実験に供した。損傷神経特異的 Drp1 を欠損させると、損傷後の軸索内のミトコンドリアは通常より長くなった。一方、細胞体のミトコンドリアは fusion はするが fission できないことにより、徐々に管状から球形に変化し、最終的には大型のバルーン状になった。これらのミトコンドリアの内部を電子顕微鏡で観察すると、内部のクリステの乱れや、空胞化がみられ、ミトコンドリアの状態が悪化していることが観察された。また、一部では、通常の損傷神経細胞では観察されないミトコンドリアがオートファゴゾームで包まれるマイトファジーも観察された。ミトコンドリアの fission が欠損した損傷運動神経では、細胞死が著しく促進された。

#### (3) オルガネラ 3次元構造の FIB/SEM 解析の有効性と今後の研究展開

本研究において、FIB/SEM を用いてミトコンドリアの形態変化を3次元的に解析したが、FIB/SEM はオルガネラの微細構造を解析するには大変良いツールである。現在これを用いることにより、細胞内の各領域におけるミトコンドリアの形態変化や小胞体の形態変化の解析に取り掛かっている。特に軸索損傷により運動神経が細胞死に至る場合と生存する場合は、オルガネラの構造に大きな変化が見られることが明らかになりつつある。今後従来得られた分子レベルでの知見と今回得られたオルガネラダイナミクスの知見を統合し、損傷神経の運命決定機序の統合的理解に繋げたい。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 6件)

木山博資、小西博之、桐生寿美子、損傷神経細胞にみられる分子とオルガネラの再編とその意義、*生体の科学*、70(1): 58-62、2019 (査読なし)

Kiryu-Seo S and Kiyama H (2018) (Review Article) Mitochondrial behavior during axon regeneration/degeneration in vivo, *Neurosci Res*, 139:42-47.

doi:10.1016/j.neures.2018.08.014. (査読あり)

Tamada H, Kiryu-Seo S, Hosokawa H, Ohta K, Ishihara N, Nomura M, Mihara K, Nakamura K-I, Kiyama H, (2017) Three-dimensional analysis of somatic mitochondrial dynamics in fission-deficient injured motor neurons using FIB/SEM, *J Comp Neurol* 525(11):2535-2548. DOI:10.1002/cne.24213 (査読あり)

Tokizane K, Konishi H, Makide K, Kawana H, Nakamura S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H, (2017) Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro, *Glia* 65(5):740-755. doi: 10.1002/glia.23123 (査読あり)

Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K, (2016) Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS, *EMBO Mol Med* 8(12):1421-1437. doi: 10.15252/emmm.201606403 (査読あり)

Kiryu-Seo S, Tamada H, Kato Y, Yasuda K, Ishihara N, Nomura M, Mihara K, Kiyama H (2016) Mitochondrial fission is an acute response against injury-induced neurodegeneration, *Sci Rep*, 6:28331. (doi: 10.1038/srep28331) (査読あり)

### [学会発表](計 5件)

Kiryu-Seo S, Kiyama H, Mitochondria in the regenerating and degenerating neurons after nerve injury, APICA, 2018, 10, 28-31, BEXCO Busan Korea, (Invited Symposium)

木山博資、新たな技術による末梢神経再生メカニズム研究の新展開、第28回日本末梢神経学会学術集会 2017年8月26日 ウィンクあいち、名古屋、愛知 (招聘 教育講演)

木山博資、セルダイナミクス・オルガネラダイナミクスをみる。第44回皮膚かたち研究学術集会 2017年7月8日 名古屋大学、名古屋、愛知 (招聘 特別講演)

Kiyama H. Lipids regulate microglial morphology and function, Cold Spring Harbor Asia Conferences, Novel insights into Glia function & Dysfunction, Suzhou, China, Dec 5-9, 2016, (招聘講演)

玉田 宏美、木山 博資、「消化管平滑筋・腸管神経系・ICCの形態学的解析」、第58回日本平滑筋学会総会(2016年8月17-19日・東北医科薬科大学 仙台、宮城)(招聘 シンポジウム)

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 連携研究者

連携研究者氏名: 桐生 寿美子

ローマ字氏名: (KIRYU-SEO, Sumiko)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 70311529

連携研究者氏名: 小西 博之

ローマ字氏名: (KONISHI, Hiroyuki)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 講師

研究者番号(8桁): 90448746

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。