

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18977

研究課題名（和文）軸索内ミトコンドリアの恒常性維持機構とその役割

研究課題名（英文）Mechanisms and roles of homeostatic maintenance of axonal mitochondria

研究代表者

大野 伸彦（Ohno, Nobuhiko）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10432155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では培養モデルにおける生細胞イメージングや最先端の3次元超微形態解析技術を用いることで、軸索におけるミトコンドリア機能維持の破綻にミトコンドリア輸送の障害が深く関わること、またミトコンドリアと小胞体との相互作用の変化とそれに関連する分子の発現が、脱髄軸索の病態に関わる可能性を明らかにした。本研究の成果は神経軸索の機能維持に関わる機構の解明に貢献するだけでなく、脱髄疾患における軸索維持を標的とした新しい治療戦略の開発につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞の代謝に重要な役割を果たし、またその動態と機能維持に関わる分子は様々な神経変性疾患における軸索障害に関与する。本研究ではミトコンドリア輸送を介するメカニズムによってミトコンドリアの機能維持が制御されていることを明らかにした。またミトコンドリアと小胞体間のオルガネラ間相互作用が神経伝達と神経の長期的生存に重要な役割を果たす髄鞘の疾病の病態生理に深く関わることを明らかにした。本研究の成果は神経軸索の機能維持に関わる機構の解明に貢献するだけでなく、脱髄疾患における軸索維持を標的とした新しい治療戦略の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using live imaging in in vitro models and cutting-edge three dimensional ultrastructural analyses, this study revealed that impaired mitochondrial transport is associated with disruption of maintenance in mitochondrial functions, and also that alterations of interaction between mitochondria and endoplasmic reticulum and molecular expression related to the interaction are associated with pathophysiology of demyelinating diseases. The results of this study contribute to elucidation of mechanisms regulating functions of neuronal axons, and would lead to development of new therapeutic strategies targeting axonal maintenance in demyelinating diseases.

研究分野：解剖学、神経科学、細胞生物学

キーワード：有髄軸索 ミトコンドリア 小胞体 脱髄 ライブイメージング 3次元超微形態解析 オルガネラ間相互作用

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

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。ミトコンドリアの動態に関わる分子は様々な神経変性疾患における軸索障害に関与し、またその制御が病態を改善する。ミトコンドリアのターンオーバーはミトコンドリアの機能維持に必須であると考えられ、また小胞体とミトコンドリアの相互作用 (Mitochondria associated membrane; MAM) はミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たすと考えられた。髄鞘は軸索の跳躍伝導と長期的生存に重要な役割を果たしており、ミトコンドリア機能の恒常性を維持する機構が軸索の生存において果たす役割は、髄鞘関連疾患において極めて大きいと考えられた。しかし、実際にミトコンドリアのターンオーバーや小胞体とミトコンドリアの相互作用がどのように維持され、そして髄鞘関連疾患でどのような役割を持つのかについては、ほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、軸索のミトコンドリアのターンオーバーとミトコンドリア-小胞体相互作用を詳細に解析する手法を確立し、関与する因子を同定するとともに、髄鞘疾患をモデルとして、その制御が軸索変性に及ぼす影響について検討することであった。そのため、無髄・有髄軸索のミトコンドリアのターンオーバーに関与する因子の役割を解明し、軸索のミトコンドリア-小胞体の相互作用の時間的・空間的变化を観察し、関与する因子の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究ではミトコンドリアのターンオーバーおよび小胞体との相互作用の時間的・空間的变化を詳細に明らかにするため、まず (i) 蛍光ラベルによるミトコンドリアと小胞体のライブイメージングと、(ii) 分子ラベルを応用した 3 次元超微形態解析を組み合わせたアプローチの確立を目指した。その後、培養モデルへの遺伝子導入や遺伝子組み換えマウスにこれらのアプローチを応用することで、関連分子の制御がオルガネラの動態や軸索の生存に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

ラット脊髄神経節培養を調整し、神経細胞にミトコンドリア標的蛍光蛋白 Dendra2 (mitoDendra2) をレンチウイルスベクターを用いて導入した。有髄および無髄軸索において紫外線照射で色変換(緑色→赤色)後、共焦点レーザー顕微鏡下で長期(10 時間以上)のライブイメージングを行い、静止ミトコンドリア内の赤色蛍光蛋白と外部から輸送される緑色蛍光蛋白のターンオーバーを観察した。その結果、多くのミトコンドリアが軸索内において非常に安定な状態で長時間静止していること、さらにより大きな静止ミトコンドリアは長時間静止することがわかった。また、変換後に色の戻る速度(ターンオーバー)と相関する因子の同定を試みたところ、軸索におけるミトコンドリアの輸送速度と輸送されるミトコンドリアの数が有意に相関することが分かった。一方で、長時間静止する大きなミトコンドリアのターンオーバーと相関する因子として、軸索におけるミトコンドリアの総量やミトコンドリアの長さ(融合傾向)はあまり影響しなかった。

次に、実際に輸送速度や輸送されるミトコンドリアの数の変化がターンオーバーに影響する可能性について検討を進めるため、DRG 神経細胞にレンチウイルスベクターを用いてミトコンドリアとその輸送蛋白を結合する Miro 蛋白を強制発現させた系を用いて、ターンオーバーの変化を解析した。Miro の強制発現はミトコンドリアの輸送を更新すると過去に報告されている。実際に強制発現させた軸索では輸送されるミトコンドリアの数が有意に増加しており、また同時にターンオーバーの速度も有意に亢進していた。次に同様にレンチウイルスベクターを用いて、ミトコンドリア融合蛋白 Mfn2 の変異蛋白(Mfn2R94Q)を発現させた系において変化を解析した。Mfn2 変異蛋白の発現は過去の報告と同様、ミトコンドリアの輸送を抑制し、またターンオーバーも抑制した。また、ミトコンドリア生成に関わる AMPK シグナルを活性化させる AICAR 処理によっても、ミトコンドリア輸送が増加し、ターンオーバーが更新することが観察された。一方で、長期の培養下ではミトコンドリア輸送とターンオーバーの減少が認められ、これらは有髄軸索の傍絞輪部で顕著であった。実際、マウス尾神経の有髄軸索の 3 次元超微形態解析では、加齢に伴って異常な形態のミトコンドリアが傍絞輪部で顕著に増加していた。以上から、軸索の静止ミトコンドリアではミトコンドリアの輸送に依存する分子のターンオーバーが起こること、加齢などによるミトコンドリアの輸送の低下が有髄軸索の傍絞輪部を中心としてミトコンドリアの異常を起こすことが示唆された。

次にミトコンドリア標識および小胞体標識蛍光蛋白を培養神経細胞に導入し、有髄および無髄軸索において共焦点レーザー顕微鏡下で長期(10 時間以上)のタイムラプスイメージングを行い、静止および輸送ミトコンドリアと小胞体の動態および光学顕微鏡レベルの共分布の時間的变化を検討した。その結果、ミトコンドリアと小胞体の分布は相関関係を示し、静止ミトコンドリアが長時間滞在している軸索部分の小胞体の蛍光強度が高い傾向がみられた。また、マウスの尾神経を用いて、ミトコンドリアと小胞体の変化をマイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡を用いて解析を開始した。その結果、ミトコンドリアと小胞体の分布に相関関係がみられ、

また豊富なミトコンドリアと小胞体の接触部 (mitochondria associated membranes) がみられることがわかった。

続いてマイクロトーム組み込み式走査型電子顕微鏡を用いて、マウスの中樞神経系の解析を行った。その結果、ミトコンドリアと小胞体の豊富な接触部 (MAM、mitochondria associated membranes) が軸索において認められた。またミトコンドリアの分裂がミクログリアの活性化に伴って顕著にみられるなどの結果が得られた。

慢性進行性脱髄モデルで、有髄および脱髄軸索におけるミトコンドリアと小胞体の3次元超微形態解析を行った。その結果、慢性脱髄下では軸索のミトコンドリアが占める体積率と、個々のミトコンドリアの体積の大きな増加がみられた。この肥大化したミトコンドリアではミトコンドリアと小胞体の接触部 (MAM) の密度の増加が認められ、また MAM に関連すると報告されている Mfn2 の発現増加を伴っていた。一方、変性した脱髄軸索においてはミトコンドリアの腫脹と同時に顕著な断片化がみられるが、MAM の密度に大きな変化は見られなかった。本脱髄モデルの結果から、軸索変性と MAM の変化は独立して制御されうること、また個々の MAM の形態的特徴とミトコンドリアの分裂融合との相関関係も明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Yoshimura T, Hayashi A, Handa-Narumi M, Yagi H, Ohno N, Koike T, Yamaguchi Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Sedzik J, Kitamura K, Kato K, Trapp BD, Baba H, Ikenaka K. GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. *Sci Rep.* (2017) 10:42257. DOI: 10.1038/srep42257. 査読有.
2. Yin X, Kidd GJ, Ohno N, Perkins GA, Ellisman MH, Bastian C, Brunet S, Baltan S, Trapp BD. Proteolipid protein-deficient myelin promotes axonal mitochondrial dysfunction via altered metabolic coupling. *J Cell Biol.* (2016) 215: 531-542. DOI: 10.1083/jcb.201607099 査読有.
3. Katoh M, Wu B, Nguyen HB, Thai TQ, Yamasaki R, Lu H, Rietsch AM, Zorlu MM, Shinozaki Y, Saitoh Y, Saitoh S, Sakoh T, Ikenaka K, Koizumi S, Ransohoff RM, Ohno N. Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes of microglia in neuroinflammation. *Sci Rep.* (2017) 7:4942. DOI: 10.1038/s41598-017-05232-0. 査読有.
4. Morizawa YM, *Hirayama Y, *Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun.* (2017) 8:28. DOI: 10.1038/s41467-017-00037-1. 査読有.
5. Shinozaki Y, Kashiwagi K, Namekata K, Takeda A, Ohno N, Robaye B, Harada T, Iwata T, Koizumi S. Purinergic dysregulation causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. *JCI Insight.* (2017) 2:93456. DOI: 10.1172/jci.insight.93456. 査読有.
6. Nguyen HB, Thai TQ, Sui Y, Azuma M, Fujiwara K, Ohno N. Methodological Improvements with Conductive Materials for Volume Imaging of Neural Circuits by Electron Microscopy. *Front Neural Circuits.* (2018) 12:108. DOI: 10.3389/fncir.2018.00108. 査読有.
7. Koseki H, Miyata H, Shimo S, Ohno N, Mifune K, Shimano K, Yamamoto K, Nozaki K, Kasuya H, Narumiya S, Aoki T. Two Diverse Hemodynamic Forces, a Mechanical Stretch and a High Wall Shear Stress, Determine Intracranial Aneurysm Formation. *Transl Stroke Res.* (2019) In press. DOI: 10.1007/s12975-019-0690-y. 査読有.
8. Takaki T, Ohno N, Saitoh S, Nagai M, Joh K. Podocyte penetration of the glomerular basement membrane to contact on the mesangial cell at the lesion of mesangial interposition in lupus nephritis: a three-dimensional analysis by serial block-face scanning electron microscopy. *Clin Exp Nephrol.* (2019) In press. DOI: 10.1007/s10157-019-01701-0. 査読有.
9. Takeda A, Shinozaki Y, Kashiwagi K, Ohno N, Eto K, Wake H, Nabekura J, Koizumi S. Microglia

mediate non-cell-autonomous cell death of retinal ganglion cells. *Glia*. (2018) 66:2366-2384. DOI: 10.1002/glia.23475. 査読有.

10. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Ikenaka K, Oda T, Ohno N. Interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinated axons. *Med Mol Morphol*. (2018) In press. DOI: 10.1007/s00795-018-0212-0. 査読有.
11. Ohno N, Ikenaka K. Axonal and neuronal degeneration in myelin diseases. *Neurosci Res*. (2019) 139:48-57. DOI: 10.1016/j.neures.2018.08.013. 査読有.
12. Nguyen HB, Sui Y, Thai TQ, Ikenaka K, Oda T, Ohno N. Decreased number and increased volume with mitochondrial enlargement of cerebellar synaptic terminals in a mouse model of chronic demyelination. *Med Mol Morphol*. (2018) 51:208-216. DOI: 10.1007/s00795-018-0193-z. 査読有.
13. Sawada M, Ohno N, Kawaguchi M, Huang SH, Hikita T, Sakurai Y, Bang Nguyen H, Quynh Thai T, Ishido Y, Yoshida Y, Nakagawa H, Uemura A, Sawamoto K. PlexinD1 signaling controls morphological changes and migration termination in newborn neurons. *EMBO J*. (2018) 37(4). pii: e97404. DOI: 10.15252/embj.201797404. 査読有.

[学会発表](計 14 件)

1. Nguyen HB, Sui Y, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Alterations of synaptic terminals in cerebellum of the chronic demyelination mouse model. 第 40 回日本神経科学大会. 2017/7/21. 千葉県幕張市
2. Sui Y, Nguyen HB, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. A novel model: optical stimulation causes axonal degeneration mediated by axoplasmic calcium. 第 40 回日本神経科学大会 2017/7/21. 千葉県幕張市
3. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Bao Wu, Zheng Huang, Ikenaka K, Ohno N. Association between mitochondria and endoplasmic reticulum in dysmyelinated axons. The 26th ISN – ESN Biennial Meeting. 2017/8/20. Paris, France
4. Nguyen HB, Sui Y, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Alterations of synaptic terminals in cerebellum of the chronic demyelination mouse model. The 26th ISN – ESN Biennial Meeting. 2017/8/20. Paris, France
5. Nguyen HB, Sui Y, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Alterations of synaptic terminals in cerebellum of the chronic demyelination mouse model. The 13th Biennial ISN Satellite Meeting Myelin Biology 2017. 2017/8/25. Embiez, France
6. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Ikenaka K, Ohno N. Increased connection between mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinated axons. 第 60 回日本神経化学学会大会. 2017/9/7. 宮城県仙台市
7. Nguyen HB, Sui Y, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Alterations of synaptic terminals in the cerebellum under chronic demyelination. 第 60 回日本神経化学学会大会. 2017/9/7. 宮城県仙台市
8. Sui Y, Nguyen HB, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. A novel model: optical stimulation causes axonal degeneration mediated by axoplasmic calcium. 第 60 回日本神経化学学会大会. 2017/9/7. 宮城県仙台市
9. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Ikenaka K, Ohno N. Relationship between axonal mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinating diseases. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2017/9/15. 岐阜県岐阜市

10. 大野伸彦. 3次元超微形態解析により見えてくる疾患の病態生理. 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2017/9/15. 岐阜県岐阜市
11. Nobuhiko Ohno. Volume EM Imaging of The White Matter. 日本顕微鏡学会第74回学術講演会. 2018/6/29. 福岡県久留米市.
12. Huy Bang Nguyen, Yang Sui, Truc Quynh Thai, 池田 一裕, 小田 賢幸, 大野 伸彦. 慢性脱髄モデルマウスにおける小脳シナプス終末の変化. 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2018/9/29. 宮崎県宮崎市.
13. 大野 伸彦. 生物組織の電子顕微鏡ボリュームイメージングに資する導電性素材と金属染色. 第27回素材工学研究懇談会(招待講演). 2018/11/12. 宮城県仙台市.
14. 大野 伸彦. 髄鞘疾患における細胞内オルガネラ変化のスーパーイメージング. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演). 2019/3/28. 新潟県新潟市.

〔図書〕(計1件)

Yang Sui, Huy Bang Nguyen, Truc Quynh Thai, Kazuhiro Ikenaka, Nobuhiko Ohno. Springer. Myelin - Basic and Clinical Advances. In "Mitochondrial dynamics in physiology and pathology of myelinated axons", 2019 In press.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

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。