

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06203

研究課題名（和文）可逆的ミトコンドリア・ダイナミクス制御による神経細胞変性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of neurodegeneration by reversible regulation of mitochondrial dynamics

研究代表者

石川 香（ISHIKAWA, Kaori）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40734827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの融合因子MFN2のドミナント・ネガティブ型変異体を神経細胞特異的に任意のタイミングで発現させることが可能なマウスモデルを用い、変異型MFN2の発現の時期や期間を変えることによる病態の変化を比較検討した。検証の結果、同一遺伝子の同一変異体であるにもかかわらず、その発現時期や期間によって現れた病態には大きな違いがあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患は、ヒトの病態進行を忠実に再現できる動物モデルに乏しく、これが病態発症機構の解明や有効な治療薬開発を困難にしている一因である。脳機能が一通り成熟する生後8週齢以降に変異型MFN2を継続的に発現させたマウスの病態は、成熟期以降に誘導される進行性の神経変性と、それに伴う行動異常や顕著な認知機能の低下であり、この病態進行はヒトの神経変性疾患とよく似ていた。このことから、神経変性疾患を模倣するモデルの樹立には、病因因子のOnsetの時期を考慮することが重要であることが伺える。本成果は、神経変性疾患領域における有効な病態モデル構築において重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using a mouse model in which a dominant-negative mutant of a mitochondrial fusion factor MFN2 can be expressed inducibly and neuron specifically, pathological differences caused by changing the timing and duration of expression of the mutant MFN2 were compared. The results showed that there was a significant difference in the pathology depending on the timing and duration of expression of the mutant MFN2, even though it was the same mutant of the same gene.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア MFN2 神経変性疾患 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、有効な治療薬に乏しい Unmet needs の高い疾患領域である。治療薬の開発には、ヒトでの病態進行を再現する動物モデルを用いた前臨床試験が欠かせないが、ヒトの神経変性疾患の病態進行を忠実に再現する動物モデルはほとんどない。これが、治療薬の開発や神経変性が起こるメカニズムの解明を困難にしている一因である。

神経細胞は胎生期に爆発的に数を増やし、出生後は外界からの刺激に応じて神経ネットワークを構築しながらシナプスの刈込みが行われ、成熟後は刺激に対する一定の可塑性を維持しながら生涯に渡って個体の行動や思考を制御している。このように、神経細胞には発達段階ごとに大きく異なる可塑性があると考えられる。可塑性の違いは、同一のストレスに対する感受性の違いを意味するかもしれない。

ミトコンドリアは、ATP 産生を担う重要な細胞小器官であり、融合や分裂を繰り返すダイナミックなオルガネラである。近年、そのダイナミクスが細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることが指摘されており、注目されている。神経細胞においても、ミトコンドリアの融合因子 MFN2 の突然変異が Charcot-Marie-Tooth 病という遺伝性ニューロパチーの原因として知られていることから、ミトコンドリアの融合不全は神経細胞にとって変性を起こし得るストレスであると推察できる。ミトコンドリアの融合や分裂は、それを担う因子の発現制御によって比較的容易に誘導でき、かつ、可逆的な現象である。すなわち、発達段階の異なる神経細胞に対して変異型 MFN2 を任意のタイミングで発現させることができれば、神経細胞の発達段階ごとに同一のストレスに対する反応の違いを評価できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

突然変異型 MFN2 を発現させることによる神経細胞に対する影響が、発現を開始させる時期や発現期間によってどのように異なるのかを比較検討することを通じて、神経細胞の可塑性の違いを評価する。

3. 研究の方法

MFN2 の機能不全型突然変異体として、実際にある家系において遺伝性ニューロパチーを発症する原因となった D210V 変異を選んだ。本変異によって、ミトコンドリアが断片化し、神経変性が誘導されていることが報告されていたためである。

この hMFN2(D210V)変異体を神経細胞特異的に、かつ Tet-off システムによって誘導性に発現させることが可能なマウスモデルを樹立し、以下の3つの異なる条件で変異型 MFN2 を発現させた場合の病態を比較検討した。

- I. 出生直後から継続的に発現させる
- II. 神経細胞や脳機能が一通り成熟する生後8週齢時点から継続的に発現させる
- III. 8週齢から120日間に限定して発現させる

4. 研究成果

上記に示す3つの異なる発現時期・発現期間において、下記のような結果が得られた。

<I. 出生直後から継続的に発現させた場合>

出生直後から変異型 MFN2 を発現させた場合、半数以上のマウスが10週齢までに死亡するという重篤な表現型を呈することが明らかとなった。10週齢時点で生存していたマウスの脳は野生型に比べて皮質が大きく萎縮しており、電子顕微鏡による観察の結果、断片化したミトコンドリアが細胞体で異常に凝集していることがわかった。このことから、若齢時の神経細胞における変異型 MFN2 の発現は急性の神経変性を引き起こし、個体の死に繋がると考えられる。

<II. 神経細胞や脳機能が一通り成熟する生後8週齢時点から継続的に発現させた場合>

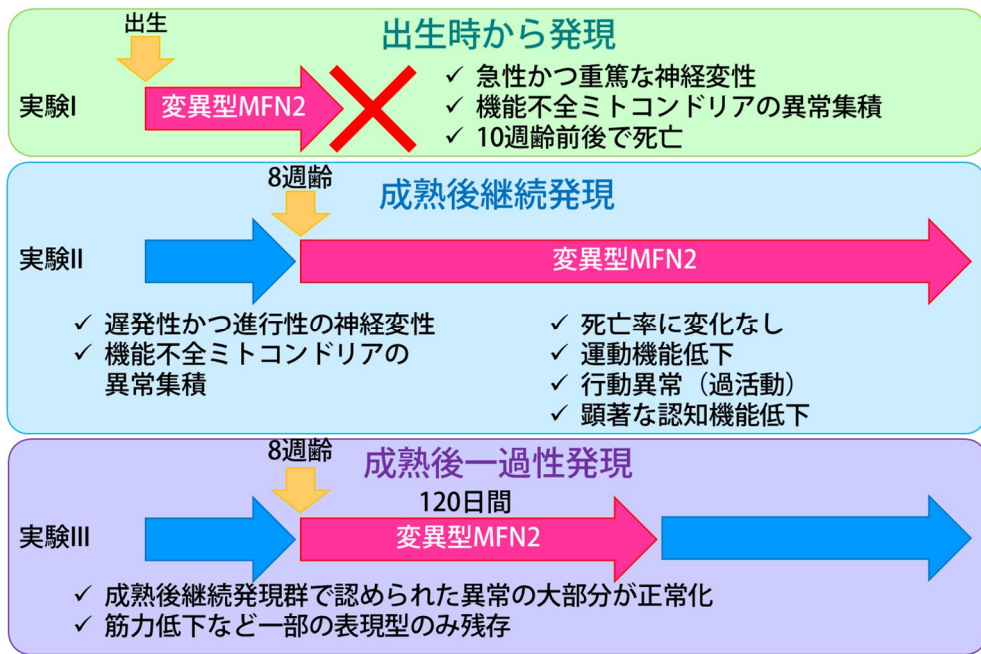
8週齢から変異型 MFN2 を発現させても、すぐに目立った異常は現れなかった。しかし、生後200日を過ぎたあたりから体重増加が鈍くなり、血糖値は次第に低下した。そして生後350日の頃には体重は顕著に対照群よりも軽くなっており、摘出した脳は皮質が萎縮していた。また、脳の切片を観察した結果、記憶を司る海馬が痕跡程度にまで縮退しており、脳機能に大きな影響があると考えられた。そこで、藤田医科大学の宮川先生の研究室が保有している施設において、生後300日頃から、大規模な行動解析を実施した。その結果、筋力の低下、運動協調性の欠落、特に夜間に顕著な過活動、学習・記憶能力の大幅な低下といったヒトの神経変性疾患と類似した様々な異常が観察された。多くの異常が認められた一方で生存率には大きな影響はなく、対照群

と有意差はなかった。

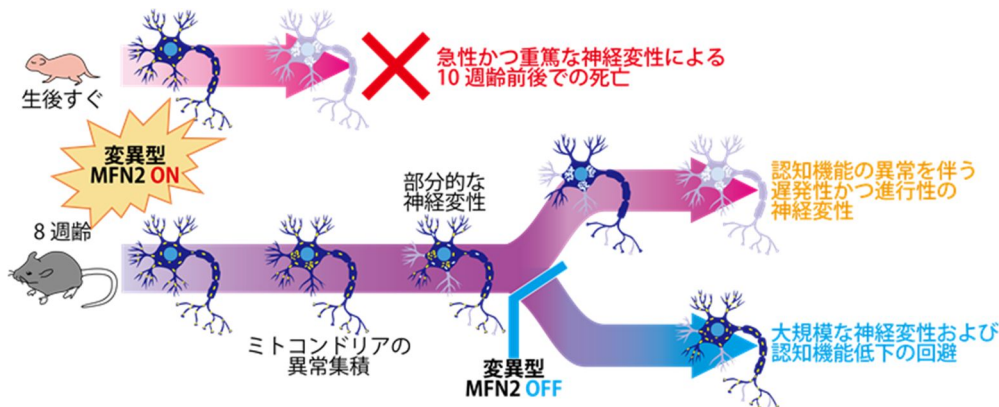
< III . 8 週齢から 120 日間に限定して発現させた場合 >

8 週齢から 120 日間だけ変異型 MFN2 を発現させると、II の継続発現群とは大きく異なる表現型が観察された。120 日間の変異型 MFN2 発現期間終了時点では、皮質に細胞死を示す TUNEL⁺ の核が観察されており、電子顕微鏡で観察すると内膜構造に異常のあるミトコンドリアや神経細胞の脱落の痕跡なども観察されたが、その後変異型 MFN2 の発現を停止したことによって細胞死はほとんど観察されなくなった。電子顕微鏡による観察では組織への一定のダメージが残っている部分も確認されたが、大部分は正常対照群と遜色ない組織像であった。行動解析の結果、筋力などごく一部の表現型は継続発現群と同程度に低下したままであったが、継続発現群で認められた運動協調性の欠落や過活動、学習・記憶能力は正常レベルを維持しており、対照群と有意な差は認められなかった。120 日間の変異型 MFN2 の発現によって、組織への一定のダメージや細胞死があったにもかかわらず、表現型としては大部分が大幅に改善し、正常対照群と遜色ないレベルにまで回復した点は特筆に値する。

上記の結果を下図にまとめた。



これらの結果から、MFN2 の機能が神経細胞の機能を維持する上で生涯に渡って重要であることがわかる。同時に、同一遺伝子の同一変異体を発現させる時期や期間を変えることによって現れる表現型が大幅に異なったことから、ヒト神経変性疾患の病態進行を模倣するモデル動物を得るためには、原因となる遺伝子の種類だけでなくその病因因子の Onset の時期や期間もまた、重要な要素であることが明らかとなった。



現在神経変性疾患領域でモデルマウスとして用いられているマウス系統の多くは、生まれつき病因因子となる遺伝子のノックアウトや過剰発現が誘導されているものである。しかし、ヒトと同様の病態進行を再現するものは少なく、モデルマウスで観察される現象のヒトへの外挿性

が極めて低いことが課題となっており、これが神経変性疾患領域における有効な治療薬の開発などを妨げる一つの要因となっている。

本研究成果は、ミトコンドリアの融合を司る MFN2 の機能不全を様々な発達段階で誘導することにより、ミトコンドリア・ダイナミクスが神経細胞の維持に重要であることを示したほか、神経変性疾患領域のモデル設計においても重要な示唆を含む成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishikawa Kaori, Yamamoto Satoshi, Hattori Satoko, Nishimura Naoya, Mito Takayuki, Matsumoto Hirokazu, Miyakawa Tsuyoshi, Nakada Kazuto	4. 巻 39
2. 論文標題 Acquired expression of mutant Mitofusin 2 causes progressive neurodegeneration and abnormal behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2139 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2139-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Kaori, Kobayashi Kohei, Yamada Akihito, Umehara Moe, Oka Toshihiko, Nakada Kazuto	4. 巻 14
2. 論文標題 Concentration of mitochondrial DNA mutations by cytoplasmic transfer from platelets to cultured mouse cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tani Haruna, Mito Takayuki, Velagapudi Vidya, Ishikawa Kaori, Umehara Moe, Nakada Kazuto, Suomalainen Anu, Hayashi Jun-Ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Disruption of the mouse Shmt2 gene confers embryonic anaemia via foetal liver-specific metabolomic disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52372-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mito Takayuki, Tani Haruna, Suzuki Michiko, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Hayashi Jun-Ichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Mito-mice and mitochondrial DNA mutator mice as models of human osteoporosis caused not by aging but by hyperparathyroidism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 509 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Haruna, Ohnishi Sakiko, Shitara Hiroshi, Mito Takayuki, Yamaguchi Midori, Yonekawa Hiromichi, Hashizume Osamu, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Hayashi Jun-Ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18828-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Kaori, Yamamoto Satoshi, Hattori Satoko, Nishimura Naoya, Matsumoto Hirokazu, Miyakawa Tsuyoshi, Nakada Kazuto	4. 巻 163
2. 論文標題 Neuronal degeneration and cognitive impairment can be prevented via the normalization of mitochondrial dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 105246 ~ 105246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phrs.2020.105246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kogame Akifumi, Ishikawa Kaori, DeJongh Joost, Tagawa Yoshihiko, Matsui Hisanori, Moriya Yuu, Kondo Takahiro, Asahi Satoru	4. 巻 41
2. 論文標題 Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the metastin/kisspeptin analog, TAK 448, for its anti tumor efficacy in a rat xenograft model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6. 最初と最後の頁 283 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdd.2245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Haruna Tani, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, and Kazuto Nakada
2. 発表標題 Human neurodegenerative disease-like phenotypes induced by acquired expression of mutant MFN2 in mice.
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 19th Conference of Japan Society for Mitochondrial Research and Medicine [J-mit] (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruna Tani, Kaori Ishikawa, Jun-Ichi Hayashi, Kazuto Nakada
2. 発表標題 Generation and analysis of trans-mitochondrial mice carrying mtDNA with a point mutation in tRNA ^{Leu} (UUR) gene.
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 19th Conference of Japan Society for Mitochondrial Research and Medicine [J-mit] (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川香
2. 発表標題 突然変異型MFN2の神経特異的な誘導性発現による病態の評価
3. 学会等名 2019年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Takayuki Mito, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuto Nakada
2. 発表標題 Progressive neurodegeneration and abnormal behavior were caused by acquired expression of mutant Mitofusin 2 in neurons.
3. 学会等名 The Cold Spring Harbor Asia conference on Mitochondria and Metabolism in Health and Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川香、小林晃平、山田亮仁、梅原萌、岡敏彦、中田和人
2. 発表標題 マウス培養細胞は組織よりも高い割合のミトコンドリアDNA突然変異を許容できる
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Ishikawa
2. 発表標題 The D210V mutation of Mfn2 in neurons induces different pathologies in severity depends on its expression timing
3. 学会等名 Keystone Symposia “Mitochondrial Biology” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Takayuki Mito, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuto Nakada
2. 発表標題 The importance of Mfn2 in neuronal function from juvenile to adult phase
3. 学会等名 International YoungMito “The 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Ishikawa, Satoshi Yamamoto, Satoko Hattori, Naoya Nishimura, Takayuki Mito, Hirokazu Matsumoto, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuto Nakada
2. 発表標題 Progressive neurodegeneration and abnormal behavior were caused by acquired expression of mutant Mitofusin 2 in neurons
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川香、山本智、服部聡子、西村尚也、松本寛和、宮川剛、中田和人
2. 発表標題 突然変異型MFN2の時期特異的発現調節による神経変性の病態比較
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学生命環境系 中田・石川研究室
http://www.biol.tsukuba.ac.jp/nakada_ishikawa/index.html

筑波大学 注目の研究
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/r201903291000.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------