

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10678

研究課題名（和文）低酸素・低グルコース下における末梢神経軸索内ミトコンドリアの動態解析

研究課題名（英文）Analysis of axonal mitochondria dynamics under oxygen-glucose deprivation in peripheral nerve

研究代表者

菊池 真（KIKUCHI, Shin）

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20404585

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）：末梢神経軸索内のミトコンドリア（Mt）における低酸素-低グルコース（OGD）の影響を観察した。軸索内Mtは、OGD暴露1時間後に輸送数が減少した。停留MtはOGD暴露6時間後に長さが減少し、電子顕微鏡による観察では、軸索内Mtが球状化していた。タイムラプス顕微鏡の観察より、軸索内Mt長が減少した原因として、輸送Mtの停止、Mtの分裂、Mt自身の短縮、が観察された。以上の事より、OGDが軸索内Mtに与える影響として、輸送Mtの抑制と停留Mtの球状化を誘導することが明らかとなった。また、停留Mtの球状化の原因として、輸送Mtの停止・Mtの分裂・Mt自身の短縮がみられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素-低グルコース（OGD）は疑似虚血として用いられる。今回、OGD暴露により初代神経細胞培養の軸索や細胞核の変性が起きる前に、軸索内ミトコンドリア動態に影響が観察されたことにより、血流障害における神経細胞障害の治療ターゲットとして、ミトコンドリアが治療標的となることが期待できた。しかしながら、今回の研究ではミトコンドリアの動態が変化することを明らかにできたが、分子レベルでの検討はされていない。今後、治療につなげるためには、OGDにより変動するであろうミトコンドリア関連分子を、明らかにすることが重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Oxygen-glucose deprivation (OGD), a model used for mimicking ischemia, eventually induces neuronal cell death similar to axonal degeneration. Axonal mitochondria are disrupted during OGD-induced neural degeneration; however, the mechanism underlying mitochondrial dysfunction has not been completely understood. We focused on the dynamics of mitochondria in axons exposed to OGD; we observed that the number of motile mitochondria significantly reduced in 1 h following OGD exposure. In our observation, the decreased length of stationary mitochondria was affected by the following factors: first, the halt of motile mitochondria; second, the fission of longer stationary mitochondria; and third, a transformation from tubular to spherical shape in OGD-exposed axons. Motile mitochondria reduction preceded stationary mitochondria fragmentation in OGD exposure; these conditions induced the decrease of stationary mitochondria in three different ways.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：ミトコンドリア 軸索 低酸素-低グルコース 末梢神経 初代培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢循環障害は種々の臓器に重篤な影響をあたえる。神経系における循環障害は中枢神経系、末梢神経系にかかわらず重篤な障害を引き起こす。神経細胞は細胞体と軸索、樹状突起からなり、糖尿病などに起因する末梢循環障害で見られる末梢神経障害は軸索の障害であると考えられる。近年、軸索内のミトコンドリア (mitochondria, Mt) の動態変化が軸索変性に先立って観察されることが報告され、注目されている文献 1-3)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血モデルとして用いられる低酸素-低グルコース (Oxygen-glucose deprivation, OGD) 暴露をおこない、ラット脊髄神経節初代培養細胞の軸索における Mt の動態を観察し、どのような変化がみられるのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

胎生 18 日のラット胎仔より脊髄神経節を取り出し、培養に用いた。軸索内のミトコンドリアを可視化するために、赤色蛍光タンパクである DsRed-2 遺伝子に Mt 移行シグナル遺伝子を付加したものをレンチウイルス内に構築し、実験に用いた。培養 4 週間後にレンチウイルスを用いて遺伝子を導入し、さらに 2 週間培養した。合計 6 週間培養した神経細胞の軸索内 Mt は、小型インキュベーターを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察し、タイムラプス像を得た。通常の培地、無糖培地、低酸素発生装置を用いて対照 (Control, Cont) 群、OGD 暴露群に分け、それぞれの刺激前 (Cont pre, OGD pre) と刺激暴露後 1 時間毎に各 20 分間、暴露後 6 時間までタイムラプスイメージを取得した (Cont 1h-6h, OGD 1h-6h)。得られたデータより Fiji を用いて kymograph を作成し、輸送 Mt の数、速度、長さ、停留 Mt の長さを計測し、比較に用いた。タイムラプス観察後、試料は anti-neurofilament protein を一次抗体とした免疫組織化学染色法により神経軸索を染色、観察し、100 μm 当たりの軸索腫脹の計測に用いた。より詳細な Mt の形態を観察するため Cont および OGD 6h について、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) を用いて神経細胞核および、軸索内 Mt を観察した。軸索内 Mt はクリステなどの微細構造を観察するとともに、Fiji を用いて aspect ratio [long axis/short axis] を算出した。統計解析ソフトは R を使用し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および、Bonferroni 法を用いて、有意差の検定を行った。

4. 研究成果

(1) OGD 暴露では軸索腫脹および神経細胞核の変化に差は観察されない (図 1)

200 以上の神経軸索を計測した結果、軸索腫脹の数は Cont 6h および OGD 6h の両群間で有意な差はみられなかった。TEM による神経細胞核の観察では、染色体の凝集や核の変形など、apoptosis や necrosis を疑う所見はみられなかった。

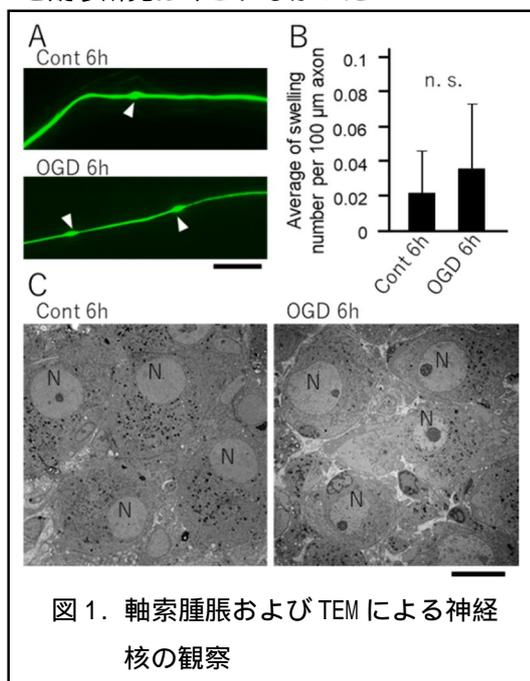


図 1. 軸索腫脹および TEM による神経核の観察

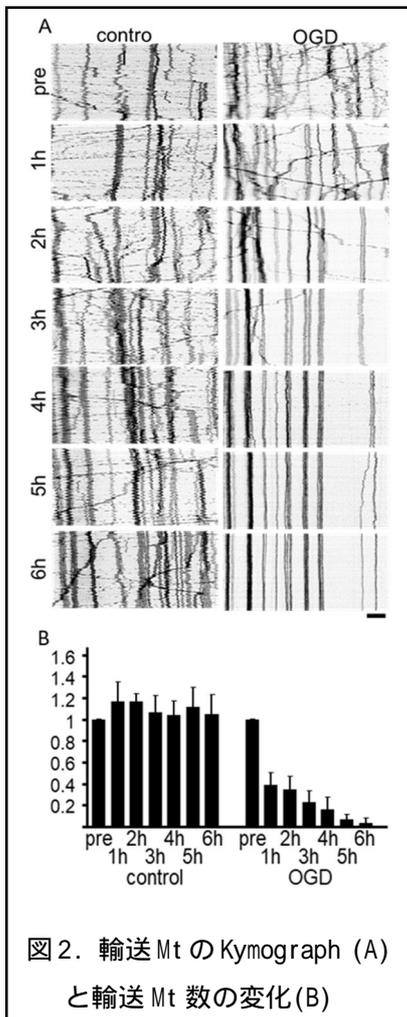


図2. 輸送 Mt の Kymograph (A) と輸送 Mt 数の変化(B)

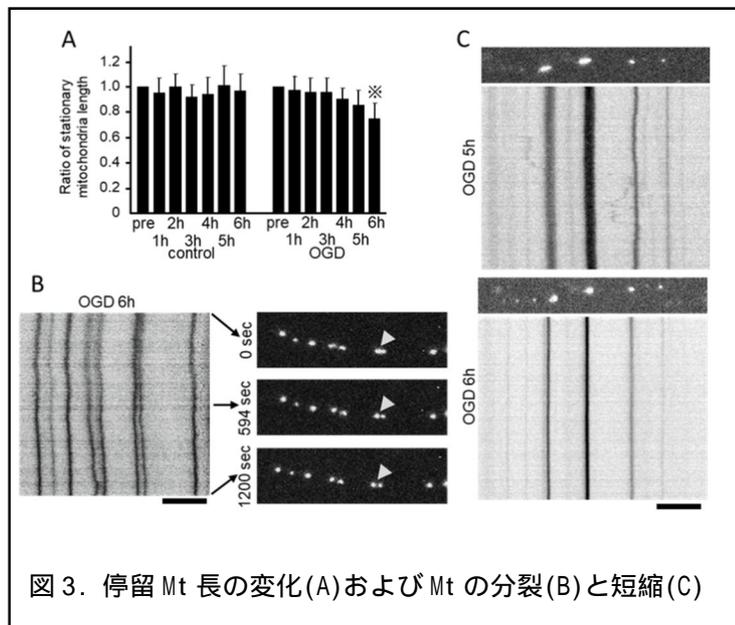


図3. 停留 Mt 長の変化(A)および Mt の分裂(B)と短縮(C)

(2) OGD 暴露により軸索内ミトコンドリアの輸送数は減少し、停留ミトコンドリアの長さは短くなる(図2, 3)

まず, OGD 暴露により輸送 Mt の速度および、長さは全ての群間で有意差はみられなかった. また, 輸送 Mt の数および停留 Mt の長さは, Cont pre と OGD pre において有意差はみられなかった. 輸送ミトコンドリアは Cont 群間では有意差がみられなかったが, OGD 暴露の1時間後に OGD pre と比較して有意に数が減少した. 停留ミトコンドリアは OGD 暴露6時間後に優位に短くなった. また, 経時的な観察により、停留ミトコンドリアの長さが有意に減少した原因として、輸送ミトコンドリアの輸送停止、ミトコンドリアの分裂、停留ミトコンドリア自身の短縮が観察された.

(3) OGD 暴露により軸索内ミトコンドリアは球状化する(図4)

Cont と OGD 6h において、軸索内 Mt の微細構造を TEM により、観察した結果、Mt の腫脹や、クリステの破壊像などは観察されなかった. また、軸索内 Mt の形態を表す指標として、aspect ratio を計測した. その結果 Cont の平均は 4.82 ± 2.42 , 2.73 ± 2.04 で、OGD 暴露により、有意な aspect ratio の減少がみられた. Aspect ratio は1に近づくほど球形となることから軸索内 Mt は6時間の OGD 暴露により球形に誘導されることが明らかとなった.

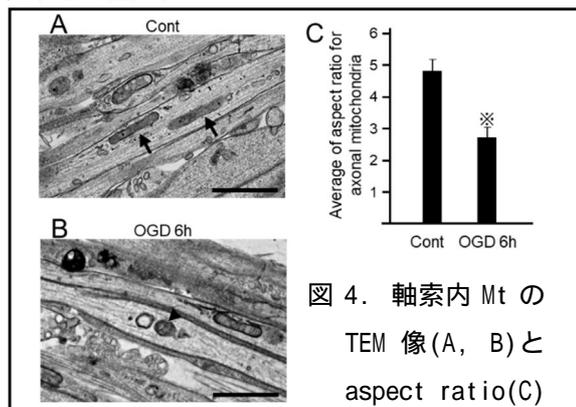


図4. 軸索内 Mt の TEM 像(A, B)と aspect ratio(C)

(4) まとめ

以上のことから OGD 暴露により軸索内ミトコンドリアは球状化が誘導され、その原因として輸送ミトコンドリアの停止、停留ミトコンドリアの分裂、停留ミトコンドリア自身の短縮によるものだと考えられた. OGD 暴露による軸索内 Mt の球状化は神経細胞の病理学的所見よりも早期に観察されることから、虚血による軸索障害の治療標的がミトコンドリアになる可能性を示唆できた.

文献

1. Bastian C, Zaleski J, Stahon K, Parr B, McCray A, Day J, Brunet S, Baltan S. NOS3 inhibition confers post-ischemic protection to young and aging white matter integrity by conserving mitochondrial dynamics and Miro-2 levels. *J Neurosci* 2018;38: 6247-6266. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3017-17.2018
2. 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
3. Kikuchi S, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, Tatsumi H. Cobalt inhibits motility of axonal mitochondria and induces axonal degeneration in cultured dorsal root ganglion cells of rat. *Cell Biol Toxicol* 2018; 34: 93-107. doi: 10.1007/s10565-017-9402-0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimada Hiroshi, Kohno Takayuki, Konno Takumi, Okada Tadahiko, Saito Kimihito, Shindo Yuma, Kikuchi Shin, Tsujiwaki Mitsuhiro, Ogawa Marie, Matsuura Motoki, Saito Tsuyoshi, Kojima Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 The Roles of Tricellular Tight Junction Protein Angulin-1/Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) in Endometriosis and Endometrioid-Endometrial Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6341 ~ 6341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13246341	査読の有無 無
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 Kojima Takashi, Shindo Yuma, Konno Takumi, Koderia Yuki, Arai Wataru, Miyakawa Maki, Ohwada Kizuku, Tanaka Hiroki, Tsujiwaki Mitsuhiro, Sakuma Yuji, Kikuchi Shin, Ohkuni Tsuyoshi, Takano Kenichi, Watanabe Atsushi, Kohno Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Dysfunction of epithelial permeability barrier induced by HMGB1 in 2.5D cultures of human epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1972760	査読の有無 無
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 Kohno Takayuki, Konno Takumi, Kikuchi Shin, Kondoh Masuo, Kojima Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Translocation of LSR from tricellular corners causes macropinocytosis at cell-cell interface as a trigger for breaking out of contact inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100299R	査読の有無 無
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 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Kikuchi Shin, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto, Kojima Takashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183503 ~ 183503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183503	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 Miyakawa Maki、Konno Takumi、Kohno Takayuki、Kikuchi Shin、Tanaka Hiroki、Kojima Takashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Increase in Epithelial Permeability and Cell Metabolism by High Mobility Group Box 1, Inflammatory Cytokines and TPEN in Caco-2 Cells as a Novel Model of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8434 ~ 8434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228434	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 Konno Takumi、Kohno Takayuki、Okada Tadahi、Shimada Hiroshi、Satohisa Seiro、Kikuchi Shin、Saito Tsuyoshi、Kojima Takashi	4. 巻 154
2. 論文標題 ASPP2 suppression promotes malignancy via LSR and YAP in human endometrial cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01876-8	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 Ando Ryosuke、Taniguchi Keigo、Kikuchi Shin、Mizoguchi Shogo、Fujimiya Mineko、Katayose Masaki、Akima Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Sarcomere length of the vastus intermedius with the knee joint angle change	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14771	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 Konari Naoto、Nagaishi Kanna、Kikuchi Shin、Fujimiya Mineko	4. 巻 9
2. 論文標題 Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40163-y	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 Kakiuchi Akito, Kohno Takayuki, Kakuki Takuya, Kaneko Yakuto, Konno Takumi, Hosaka Yukino, Hata Tomohiro, Kikuchi Shin, Ninomiya Takafumi, Himi Tetsuo, Takano Kenichi, Kojima Takashi	4. 巻 67
2. 論文標題 Rho-kinase and PKC Inhibition Induces Primary Cilia Elongation and Alters the Behavior of Undifferentiated and Differentiated Temperature-sensitive Mouse Cochlear Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 523 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419841013	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 Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kikuchi Shin, Shimada Hiroshi, Satohisa Seiro, Takano Kenichi, Saito Tsuyoshi, Kojima Takashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Localization of Tricellular Tight Junction Molecule LSR at Midbody and Centrosome During Cytokinesis in Human Epithelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 59 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419886263	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菊池 真、二宮孝文、辰巳浩之
2. 発表標題 低酸素・低グルコース(OGD)における初代培養末梢神経節細胞軸索におけるミトコンドリア動態の観察
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 真、二宮孝文、辰巳治之
2. 発表標題 短時間の低グルコース・低酸素が軸索内のミトコンドリアに与える影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤良介、谷口圭吾、菊池 真、溝口照悟、藤宮峯子、片寄正樹、秋間 広
2. 発表標題 膝関節角度と中間広筋および外側広筋のサルコミア長の関係
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 真、二宮孝文、辰巳治之
2. 発表標題 短時間の低グルコース・低酸素が軸索内のミトコンドリアに与える影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------