

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17967

研究課題名(和文) ワーラー変性における細胞内エネルギー代謝の病態解明

研究課題名(英文) Pathological analysis of changes in intracellular energy metabolism during wallerian degeneration

研究代表者

竹中 朋文 (Takenaka, Tomofumi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60869527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ワーラー変性(WD)の病態の構成因子の一つとしてアデノシン三リン酸(ATP)が知られているが、ATP産生に関わるエネルギー代謝経路は未解明な点が多い。そこで本研究は、細胞内ATPのin vivoイメージングを利用し、WDにおけるATPのエネルギー代謝経路の変化の解明を目的とした。末梢神経遠位では、シュワン細胞内の解糖系亢進に伴い産生されたピルビン酸が、MCTを介して軸索に輸送され、軸索内にて解糖系亢進によって代謝され、ATP維持・WD遅延に関連する可能性が示された。一方クエン酸回路の関連は乏しいことも示唆された。本研究の更なる発展は、WDに対する新規治療開発に貢献する可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ワーラー変性におけるエネルギー代謝(ATP)の詳細な動態に加え、今まで明らかにされていなかったエネルギー産生に関わる経路を明らかにした。ワーラー変性は、代表的である末梢神経の損傷以外にも脳卒中や変性疾患など、ほぼすべての神経系疾患において共通してみられる病態である。したがって、本研究の発展によって、これら神経系疾患に対する病態の理解が進むとともに、将来的な創薬・治療開発に寄与する可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Axonal injury causes Wallerian degeneration (WD) in the distal nerve stump, but adenosine triphosphate (ATP) behavior remains unclear. We examined the change in ATP levels and biochemical pathways associated with WD using the GO-ATeam2 knock-in mouse and rat sciatic nerve transection model and in vivo ATP imaging. In the distal stump after axotomy, ATP levels gradually decreased with WD progression. The glycolytic system and monocarboxylate transport via MCTs were also activated, with the progression of mitochondrial atypicality in axons. Our findings suggest that in the distal nerve stump, the glycolytic system and monocarboxylate transport via MCTs are activated to supply axonal ATP. Our study provides a basis for understanding the bioenergetics during WD, and could be used in the development of therapeutic agents.

研究分野：神経代謝

キーワード：ワーラー変性 解糖系 アデノシン3リン酸 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

神経系において、損傷遠位部の軸索はワラー変性 (WD) をきたすことが知られている。古典的には WD は末梢神経損傷遠位の変性とされているが、その病態変化は神経疾患全般に共通してみられる。したがって、WD の病態解明は、末梢神経障害のみならず、脳卒中や変性疾患といった中枢系の神経疾患に対しても、創薬や治療法開発のために意義があると考えられる。

WD における主要な関連因子の一つにアデノシン三リン酸 (ATP) がある。ATP はサルベージ経路で利用される。ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) と ATP は、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニン転移酵素 2 (NMNAT2) によって触媒され、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を生成する。NAD⁺ は、WD 中に切断遠位の ATP レベル維持に寄与する。

しかしながら、損傷遠位神経の ATP が具体的にどのような時間空間的变化を示すのかは分かっていない。近年の研究では、損傷遠位の ATP 維持には、シュワン細胞内の解糖系活性化と、産生物である乳酸・ピルビン酸のモノカルボン酸輸送体 (MCT) を介した軸索内への輸送が関連することが示唆されている。一方、ATP の主な供給源であるミトコンドリアは、軸索内では損傷早期より変性することも知られている。したがって、WD における ATP の時間空間的な変化、ならびにその産生源は、依然として解明されていない。

2. 研究の目的

遺伝子導入により *in vivo* での ATP 測定を可能とする GO-ATeam2 プローブを用いて、損傷遠位 ATP の時間空間的变化、ならびに産生源を明らかにすることである。

3. 研究の方法

全ての実験に GO-ATeam2 ノックインマウス・ラットの坐骨神経切断モデルを実験に用いた。坐骨神経切断遠位における ATP の時間空間的变化を正確に計測すべく、*in vivo* にて蛍光顕微鏡 (M165 FC; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) および二光子顕微鏡 (A1R MP+; Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。

また、切断遠位 3mm 部の組織を採取し、エポン包埋にて標本を作製した。1 μ m の切片は蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で観察し正常な軸索数の計測に用いた。さらに 90nm 厚の切片も作成し、電子顕微鏡 (H-7500; Hitachi, Tokyo, Japan) にて G-ratio、ミトコンドリア径および異型度の評価を行った。

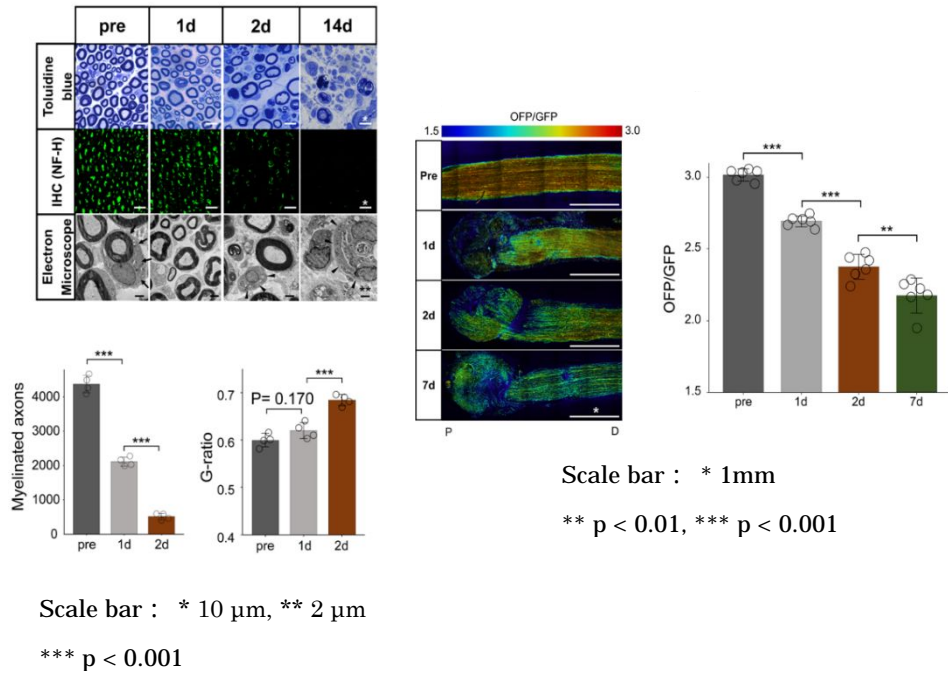
さらに、切断端から 7mm の範囲を採取し、解糖系やクエン酸回路を含めたエネルギー代謝産物の質量分析 (LC-MS software, Shimadzu, Japan) も実施した。

最後に、右坐骨神経の切断直後、あるいは神経のみを露出した状態 (sham と定義) で、各種阻害剤およびピルビン酸エチル (EP) を、定められた濃度でゼラチンスポンジに浸し、薬液が外部に漏出しないように 3mm 径の PVC チューブで神経を包埋した。薬剤処理の 24 時間後に、上述の ATP のイメージング、組織評価を実施した。

4. 研究成果

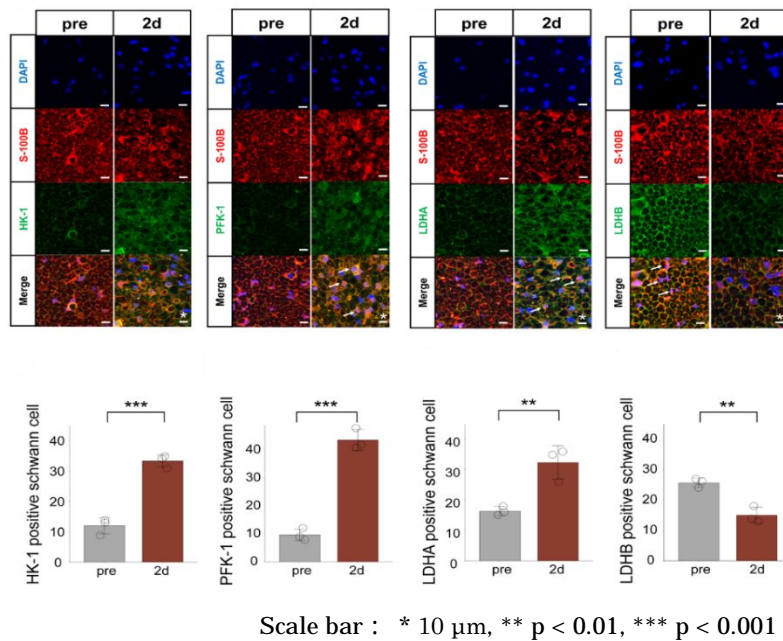
坐骨神経切断遠位において、ATP は切断 1 日後より徐々に低下し、切断 2 日後に明瞭化する WD の進行に先行していた (図 1)。したがって、WD において、ATP は損傷後 WD に先行して緩徐に低下していくことが示された。

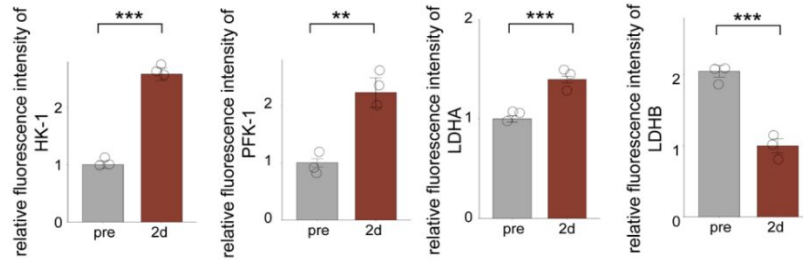
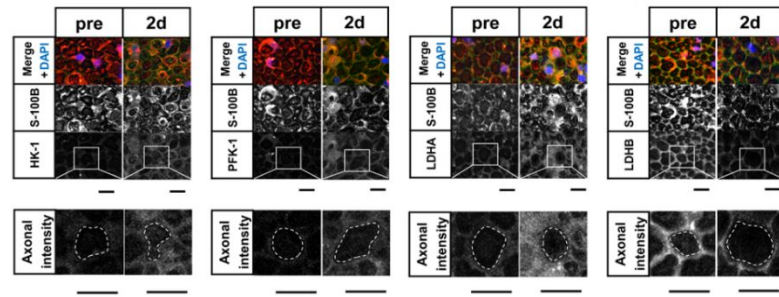
図 1



続いて、切断 2 日後の免疫染色では解糖系のシュワン細胞・軸索内での活性化を示したため、切断遠位神経の ATP 産生源として、シュワン細胞と軸索内双方における解糖系の関連が示唆された。

図 2





Scale bar : 10 μ m, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

そこで、切断遠位において解糖系阻害剤（2-DG）を局所投与したところ、DMSO 投与群よりも ATP が低下し、WD が進行した。また、MCT 阻害剤（4-CIN）投与は 2-DG 投与群と同様に ATP 低下と WD の進行を示した。一方でクエン酸回路阻害剤（MSDC-0160）投与は上述の変化を示さなかった。さらに、モノカルボン酸であるピルビン酸エチル（EP）の局所投与により、生理食塩水投与群に比して、ATP の増加と WD 進行の遅延効果が示された。

これらの結果から、末梢神経遠位では、シュワン細胞内の解糖系亢進に伴い産生されたピルビン酸が、MCT を介して軸索に輸送され、軸索内にて解糖系亢進によって代謝され、ATP 維持・WD 遅延に関連する可能性が示された。本研究の更なる発展は、WD に対する新規治療開発に貢献する可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takenaka, T., Ohnishi, Y., Yamamoto, M., Setoyama, D., and Kishima, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Glycolytic System in Axons Supplement Decreased ATP Levels after Axotomy of the Peripheral Nerve.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eNeuro	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） 10.1523/ENEURO.0353-22.2023	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹中 朋文, 大西 諭一郎, 山本 正道, 瀬戸山 大樹, 貴島 晴彦
2. 発表標題 末梢神経損傷における、細胞内エネルギー代謝の病態解析
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会 第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中 朋文, 大西 諭一郎, 中島 伸彦, 山本 正道, 貴島 晴彦
2. 発表標題 末梢神経損傷における、細胞内エネルギー代謝の病態解析
3. 学会等名 第44回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2020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
---------	---------