

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659018

研究課題名（和文） ミトコンドリアと神経細胞死

研究課題名（英文） Neuronal cell death mediated by mitochondria

研究代表者

米田 幸雄 (YONEDA YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50094454

研究成果の概要（和文）：Glu や NMDA に対する脆弱性相違に、ミトコンドリア膜電位、mPTP 形成能、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度、および UCP2 発現量等の相違が少なくとも一部は関与する可能性が判明した。人工的 NMDAR チャンネルにさらに UCP2 発現ベクターを導入すると、NMDA 曝露に伴ってミトコンドリア内遊離 Ca^{2+} 濃度の著明な上昇とともに、著明な細胞死が出現した。海馬神経細胞における NMDA 毒性脆弱性の出現には、ミトコンドリア内膜に発現する UCP2 発現量が関与すると推察される。

研究成果の概要（英文）：Glutamate neurotoxicity was found to at least in part involve mitochondrial membrane potential disruption, mPTP orchestration, mitochondrial free Ca^{2+} levels and UCP2 expression in rat hippocampal and cortical neurons. In HEK293 cells with acquired NMDAR channels and overexpressed UCP2, a more marked increase was seen in mitochondrial free Ca^{2+} levels, in addition to more severe cell death, after the exposure to NMDA than in cells without UCP2 overexpression. Accordingly, UCP2 could play a role as a determinant of the neurotoxicity mediated by NMDAR through a mechanism related to the modulation of mitochondrial free Ca^{2+} levels in neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	0	1,900,000
2010 年度	600,000	0	600,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ミトコンドリア, 神経細胞死, NMDA, グルタミン酸, 脳虚血

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞発症時には、梗塞部位における細胞外グルタミン酸(Glu)濃度の異常な上昇によって、N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体の過度の活性化を介する遅発性神経細胞死が引き起こされるが、神経細胞のシナプス部に発現する NMDA 受容体は神経細胞保護的

であるのに対して、シナプス外に発現する NMDA 受容体は神経細胞障害的に働くので、NMDA 受容体阻害剤の適用は、神経細胞保護的に働く NMDA 受容体の活性阻害によって、時として虚血性神経細胞死をむしろ増悪する可能性が考えられる。さらに、動物実験では脳虚血負荷後に海馬 CA1 領域および扁桃体に限局する遅発性の神経細胞脱落

が観察されるが、この脳内部位選択的な脆弱性の出現機序は未だ明らかにはなっていない。我々は、大脳皮質由来神経細胞では NMDA は全く障害性を示さず、海馬由来細胞でのみ神経細胞死が観察されるという、上記 *in vivo* 研究結果と近似する実験系を樹立することに成功したが、この時には両者間の細胞内 Ca^{2+} 濃度には著明な差が見られないので、選択的脆弱性を引き起こす“障害因子”が脆弱性相違に関与する可能性が高いと推察される。

一方、ミトコンドリアは細胞のエネルギーを生み出すオルガネラであるとともに、Cytochrome C の放出によって細胞死を誘導する、まさに細胞の生死を調節する器官である。近年、Cytochrome C の放出担体を制御する Cyclophilin D のノックアウトマウスでは、虚血後の神経細胞死が大幅に減少することが報告されている。今回我々は、NMDA を曝露すると海馬由来の神経細胞でのみ、ミトコンドリアの脱分極と Ca^{2+} 流入が観察されるとの実験結果から、このミトコンドリアマトリックス内へ Ca^{2+} を輸送する担体である ユニポーター(mitochondrial calcium uniporter) が前述の障害因子である可能性を提唱したい。事実、Glu による神経細胞死はミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を阻害するとほぼ完全に抑制されるが、概念としては高い注目を浴びながら、このユニポーターの分子実体は未だほとんど解明されていない。その意味では、NMDA 毒性脆弱性の海馬神経細胞では NMDA 曝露に伴うミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察されるのに対して、耐性を示す大脳皮質神経細胞では NMDA を曝露しても、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度には著変が誘発されないという我々の興味深い発見を基盤として、本研究課題を提案した次第である。

2. 研究の目的

大脳皮質と海馬それぞれの神経細胞のミトコンドリアについて、発現の異なるタンパク性因子を二次元電気泳動法による探索と、LC/MS 法による同定を組み合わせる網羅的に一斉解析する予定である。研究期間内に同タンパク性因子の分離と同定を可能な限り完了したいが、最低限の目標としては障害因子の探索と発見、および分離まで到達する計画である。神経細胞の NMDA 脆弱性を決定するミトコンドリア内在性因子の発見は、脳科学分野における NMDA 受容体の重要性を勘案するまでもなく、種々の神経変性疾患や神経精神疾患の発症メカニズム解明を通じて、予防性食品や治療性医薬品

の開発促進の観点から、広く国民の健康と福祉の維持とともに、新産業創出にも貢献する可能性があるところに大きな社会的意義がある。また、今回の研究構想はすべて国内の研究機関で実施された研究代表者の研究成果を基盤とするので、当該研究分野におけるわが国の国際的優位性確保のためには、現時点での研究活動実施が千載一遇の機会であるところに特色がある。本研究計画実施のみで上記目標が達成されることがあり得ないのは当然であるが、本課題研究遂行が端緒となって NMDA 神経毒性防御を標的とする創薬研究が活発に展開されることを期待したい。

3. 研究の方法

本研究計画では、大脳皮質および海馬由来の神経細胞の NMDA 毒性脆弱性を決定するミトコンドリア内在性因子の探索と分離、同定およびクローニングを第一義の目標とする。同定後の因子については、培養神経細胞へのノックインやノックダウンに伴う、ミトコンドリア Ca^{2+} 流入変動を測定して、実際のユニポーター分子であるかどうかの判断材料とする。

同定タンパク質がミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みに関与する分子であるかどうかを検討するために、まずは HEK293 細胞に同タンパク質を過剰発現させる。その後、ジギトニンで処理した細胞、あるいは A23187 のような Ca^{2+} イオノフォアを作用させて、細胞膜のカルシウム透過性を選択的に高めた細胞において、細胞外 Ca^{2+} 濃度を変化させたときのミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入量の検討を行う。もしくは、同細胞から単離したミトコンドリアを用いて、*in vitro* の実験条件下でミトコンドリア外 Ca^{2+} の取り込み活性を評価する。すなわち、HEK293 細胞に当該遺伝子を過剰発現させたのち、細胞を遠心分離して得られたミトコンドリア画分を、さらにミトコンドリアの純度を上げるためにパーコール密度勾配遠心分離する。得られたミトコンドリアは Calcium Green-5n (Molecular Probes) を添加した細胞内イオン組成を持つ緩衝液中に再懸濁し、蛍光光度計によってミトコンドリア外 Ca^{2+} 濃度を測定する。このとき、遊離 Ca^{2+} をミトコンドリア外に連続的に適用することによって、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み活性を評価する。同時に、大脳皮質由来の神経細胞についてもアデノウイルスベクターに組み込んだ同分子を過剰発現させて、NMDA 毒性に対する感受性を検討する。

4. 研究成果

本研究では、グルタミン酸(Glu)の神経毒性出現メカニズムにおけるミトコンドリアの関与を解明する目的で、ラット脳由来培養神経細胞の生存率と機能変化について解析した。海馬由来神経細胞をGluまたはN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)に1時間曝露すると、その24時間後には著明な細胞死が誘発されたが、大脳皮質由来細胞ではこのような細胞死は観察されなかった。しかしながら、NMDA曝露に伴う細胞内遊離Ca²⁺濃度上昇には両部位間細胞に相違は見られなかった。海馬神経細胞では、NMDA曝露に伴って急速なミトコンドリア膜電位の脱分極とともに、cytochrome C放出担体mitochondrial permeability transition pore (mPTP)の形成が観察された。これに対して、大脳皮質神経細胞ではこのような変化はいずれも招来されなかった。Cyclophilin D等のmPTPを構成する分子群のmRNA発現量やmPTPを活性化する薬物の添加の影響には、いずれも両部位由来の神経細胞間で差異は見られなかったが、NMDA曝露後のミトコンドリア内Ca²⁺濃度上昇は海馬の方が大脳皮質よりも2倍以上高いことが判明した。しかしながら、プロトン勾配形成に関与する電子伝達系分子のmRNA発現量は、両脳内部位由来神経細胞間で相違は見られなかった。これに対して、脆弱性の高い海馬由来標品では、uncoupling protein(UCP)群の中でも特にUCP2の発現量が、抵抗性の高い大脳皮質由来標品よりも有意に高い事実が判明した。

これらの研究成績を基に、細胞質内とミトコンドリア内の遊離Ca²⁺濃度を、それぞれ蛍光イメージング法により比較検討したところ、細胞内遊離Ca²⁺濃度については両脳内部位由来神経細胞間でGlu曝露に伴う相違は見られなかった。一方、ミトコンドリア内遊離Ca²⁺濃度は、海馬由来神経細胞ではGlu曝露に伴って急速に上昇したのに対して、大脳皮質由来神経細胞ではこのような急激な変動は観察されなかった。さらに、Glu脆弱性の高い海馬由来神経細胞では、抵抗性の高い大脳皮質由来神経細胞に比べて、uncoupling protein(UCP)群の中でも特にUCP2の発現量が有意に高い事実が判明した。次いで、Glu毒性出現メカニズムへのUCP2の関与の可能性を追究するために、NMDAR各サブユニット発現ベクターを導入して、人工的NMDARチャネルをHEK293細胞に構築した。これらの細胞にGluやNMDAを曝露すると、その濃度依存的に細胞内およ

びミトコンドリア内遊離Ca²⁺濃度が上昇したが、いずれの上昇もNMDARアンタゴニスト添加に伴って消失した。この細胞にさらにUCP2発現ベクターを導入すると、Glu曝露に伴って細胞内遊離Ca²⁺濃度は変化せずに、ミトコンドリア内遊離Ca²⁺濃度だけが著明に上昇した。このUCP2強制発現細胞では、GluやNMDA曝露に伴う細胞死が著明に出現した。

以上の結果より、海馬神経細胞におけるNMDA毒性脆弱性の出現には、ミトコンドリア内膜に発現するUCP2発現量が関与する可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 38 件)

- ① Fukumori R*, Takarada T*, Kambe Y, Nakazato R, Fujikawa K & Yoneda Y (2012) Possible involvement of mitochondrial uncoupling protein-2 in cytotoxicity mediated by acquired N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurochem Int.* in press. *Equally contributed. 査読有
DOI:10.1016/j.neuint.2012.03.019
- ② Fujita H*, Hinoi E*, Nakatani E, Yamamoto T, Takarada T & Yoneda Y (2012) Possible modulation of process extension by N-methyl-D-aspartate receptor expressed in osteocytic MLO-Y4 cells. *J Pharmacol Sci.* in press. *Equally contributed. 査読有
DOI:未定
- ③ Iezaki T*, Hinoi E*, Yamamoto T, Ishiura R, Ogawa S & Yoneda Y (2012) Amelioration by the natural polyamine, spermine, of cartilage and bone destruction in rats with collagen-induced arthritis. *J Pharmacol Sci.* in press. *Equally contributed. 査読有
DOI:未定
- ④ Fujikawa K*, Nakamichi N*, Kato S, Fukumori R, Hida M, Takarada T & Yoneda Y (2012) Delayed mitochondrial membrane potential disruption by ATP in cultured rat hippocampal neurons exposed to N-methyl-D-aspartate. *J. Pharmacol. Sci.* in press. *Equally contributed. 査読有
DOI:10.1254/jphs.12034FP
- ⑤ Takarada T, Takarada-Iemata M, Takahata Y, Yamada D, Yamamoto T, Nakamura Y, Hinoi E & Yoneda Y (2012) Osteoclastogenesis is negatively regulated by D-serine produced by osteoblasts. *J Cell*

Physiol. in press. 査読有

DOI: 10.1002/jcp.24048.

- ⑥ Yamamoto T*, Hinoi E*, Fujita H, Iezaki T, Takahata Y, Takamori M & Yoneda Y (2012) Natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disturbance of osteoclastic activation in ovariectomized mice. Br J Pharmacol. in press. *Equally contributed. 査読有
DOI: 10.1111/j.1476-5381.
- ⑦ Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani E, Iezaki T, Nakajima H, Fujita H, Takahata Y, Hidano S, Kobayashi T, Takeda S & Yoneda Y (2012) Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor-15 up-regulated in osteocytic cells under hypoxia. J Bone Miner Res. in press. 査読有
DOI: 10.1111/j.1476-5381.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Yoneda Y, (Neurotoxic NMDA signals mediated by mitochondria) APSN/ISN Neuroscience School, 2012.2.15, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University (China)
- ② Yoneda Y, Takeshi Takarada and Yuki Kambe (NMDA NEUROTOXICITY MEDIATED BY MITOCHONDRIA)The Glutamatergic Synapse, 2011.9.2, Megaron Athens International Conference Centre (Greece)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：神経細胞新生促進組成物

発明者：米田幸雄, 宝田剛志, 川越博文

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2010-254320 号

出願年月日：2010 年 11 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 幸雄 (YONEDA YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50094454

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし