

## 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25年5月10日現在

機関番号：17701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790256  
 研究課題名(和文) 虚血性神経細胞死における神経特異的ミトコンドリアの病態生理学的意義の解明  
 研究課題名(英文) Pathophysiological relationship of mitochondria to neuronal death during brain ischemia  
 研究代表者  
 神戸 悠輝(KANBE YUKI)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：60549913

### 研究成果の概要(和文)：

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は、神経突起形成に寄与するが、詳細なメカニズムは解明されていない。一方、ミトコンドリアも神経細胞の分化と成熟に重要な事が知られる。そこで、本研究ではPACAPによる神経突起形成過程におけるミトコンドリア寄与を解析した。その結果、PACAPによる神経突起の形成促進作用にはPgc1 $\alpha$ を介したミトコンドリアの活性化が重要であると推察される。

### 研究成果の概要(英文)：

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) increases neurite outgrowth in many kind of neuronal cells, but signaling via its receptor PACAP-specific receptor has not been fully characterized. Because mitochondria also play an important role in neurodevelopment including dendritic branching, axonal guidance and neurite outgrowth, we examined whether mitochondria contribute to PACAP-mediated neurite outgrowth. Present data suggest that mitochondrial activation plays a key role in PACAP-induced neurite outgrowth via a signaling pathway that includes PAC1R, PKA, and Pgc1 $\alpha$ .

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経細胞死，細胞内情報伝達，ミトコンドリア

#### 1. 研究開始当初の背景

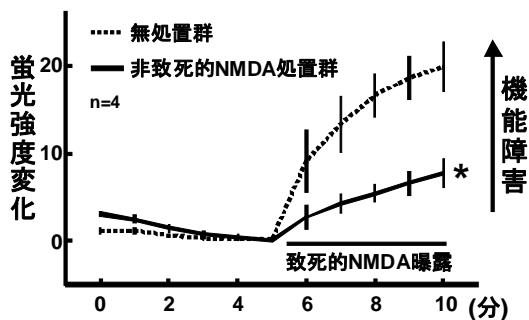
ミトコンドリアはATPを生産し細胞にエネルギーを供給するとともに、細胞死因子を介

シアポトーシスを誘導する細胞の生と死をつかさどるオルガネラである。申請者は同じ神経細胞でも脳内部位により虚血脆弱性

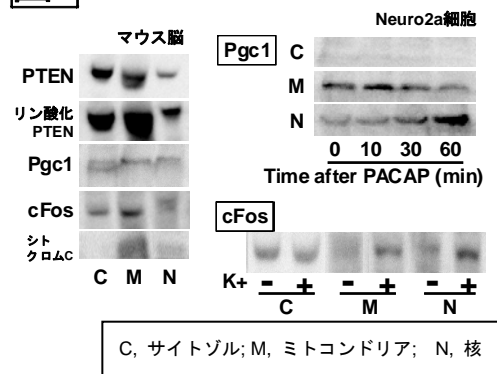
が異なり、この脆弱性の違いは脳内部位特異的なミトコンドリアの性質に依存する事を報告し(文献 1)、ミトコンドリアと虚血性神経細胞死の積極的な関連性を裏付けた。さらに、神経細胞への致死的な濃度の N-methyl-D-aspartate (NMDA) の曝露はミトコンドリア機能障害と共に細胞死を誘発するが、非致死的な濃度の NMDA で事前に処置した細胞は致死的な濃度の NMDA に耐性になるばかりか、ミトコンドリア機能障害も抑制される事実を見出した(図 1)。一方、同じ神経細胞内でも高頻度に刺激を受けるスパインのミトコンドリアとそれ以外のミトコンドリアでは性質が異なり、スパインのミトコンドリアは細胞死を誘導しにくいと報告されている(文献 2)。以上の知見より、神経細胞のミトコンドリアは刺激に応じてミトコンドリア自体の機能を変化させるという着想にいたった。しかし、ミトコンドリアを起点とする情報伝達の機構はほとんど解明されていない。そこで、まず予備的に「細胞内情報伝達分子」の脳ミトコンドリアでの発現を網羅的に検討すると、PTEN、リン酸化 PTEN、Pgc1 $\alpha$  および cFos が定常状態において脳ミトコンドリアに高濃度存在することが明らかとなった(図 2, 左パネル)。さらに、神経細胞保護効果のある Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) と高濃度 K<sup>+</sup> で神経系の細胞である Neuro2a を刺激すると、PACAP の曝露では経時的なミトコンドリアでの Pgc1 発現減少と、核での発現増強が観察され、高濃度 K<sup>+</sup> の曝露では核とミトコンドリアで cFos 発現を誘導した(図 2, 右パネル)。

これらの結果より、申請者は神経細胞への刺激が、ミトコンドリア内に存在する情報伝達分子の分布の変化を介して、ミトコンドリア自体の機能を調節する可能性を世界に先駆けて見出した。

**図1** 非致死性NMDA前処置によるミトコンドリア機能障害抑制



**図2** 情報伝達分子の細胞内分布



## 2. 研究の目的

一般的な刺激は核を介して細胞全体の機能を調節するが、刺激に応じて性質の異なるミトコンドリアを生成する機構として、ミトコンドリアを介した情報伝達機構が存在する可能性がある。さらに、ミトコンドリア機能(ATP合成能)と神経細胞保護には密接な関係が報告されていることから、このような情報伝達機構がミトコンドリア機能の制御を介して神経細胞保護に寄与するという仮説をたてた。

そこで、本研究では Pgc1 $\alpha$  および cFos を足がかりとしてミトコンドリアを介した情報伝達機構の、ミトコンドリア機能制御による神経保護作用を解明する。

## 3. 研究の方法

細胞培養、胎生 15 日齢のマウス胎児より海馬と摘出し、トリプシン処理後、培養用プラスチックディッシュに播種した。Neuro2a 細胞は 10% の血清添加 DMEM で培養した。これらの細胞に、PACAP、PACAP 特異的受容体である PAC1 受容体の特異的なアゴニストであるマキサディラン、フォルスコリンを暴露した。また、プロテインキナーゼ A の阻害剤である H89、ERK の阻害剤である PD98059 とミトコンドリアの脱共役剤である CCCP は PACAP の暴露 30 分前から添加した。

神経突起の定量、上記の薬物を暴露した両細胞の神経突起の長さを、ImageJ を用いて突起の長さから細胞体の長さを割ることによって規格化し、定量化した。

ウェスタンブロッティング、PACAP の暴露、非暴露条件下において海馬神経細胞、Neuro2a 細胞、マウス海馬からタンパク質標品を回収し、Pgc1 $\alpha$ 、シトクロム C、シトクロム C 酸化酵素サブユニット 4、シナプシン 1、PSD95、MAP2 および cFos を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

免疫染色法, 両細胞を4%のparaformaldehydeで固定した後, 一次抗体としてMAP2とPac1受容体に対する抗体を, 二次抗体にはCF488またはAlexa488で標識された抗ウサギIgGおよび抗マウスIgGに対する抗体を用いた. その後, LSM700を用いて観察した. ミトコンドリア膜電位の測定,

5, 5, 6, 6-tetra-chloro-1, 1, 3, 3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)は脂溶性の蛍光色素であり, ミトコンドリアに集積し, ミトコンドリアの膜電位により会合しエミッション光が緑色から赤色に変化することが知られている. PACAP暴露および非暴露条件下において1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のJC-1で10分間染色の後, LSM700で蛍光画像を取得した. 得られた緑色および赤色蛍光画像の蛍光強度をそれぞれImageJで定量し, 蛍光強度の比をとることで, ミトコンドリア膜電位の指標とした.

siRNA トランスフェクション, Neuro2a細胞にPgc1 $\alpha$ と相補的なsiRNAをトランスフェクションし, その後PACAPの暴露および非暴露条件下における神経突起の形成とミトコンドリア膜電位を検討した.

In vivoにおける検討, 10週齢のマウスにPACAPを10 nmol/kg/dayで6日間尾静脈投与したのち, 海馬を摘出しタンパク質標品としてウェスタンブロットングに供した.

発現プラスミドベクターの作成, pEGFP-N1にマウス由来シトクロムC酸化酵素サブユニット8のミトコンドリア移行シグナル3個とcFosのコーディング領域を組み込んだ発現ベクター(mit-cFos/pEGFP-N1)を構築した.

ステーブル細胞の作成, Neuro2a細胞にFuGene6を用いてmit-cFos/pEGFP-N1をトランスフェクションし, ジェネティシンを用いてステーブルにmit-cFos/pEGFP-N1を発現する細胞をクローン化した.

In vitro 虚血, Neuro2aの培養メディアウムをグルコース, 血清不含有N<sub>2</sub>ガスを30分間バブリングしたDMEMに交換し, アネロパックとともにアネロパックチャンバーに入れ6時間インキュベーションした. その後, 通常の培養メディアウムに戻し, 回復させた.

MTT アッセイ, 培養メディアウムを0.1 mg/mLのMTTを含有したPBSに置換し, 1時間インキュベーションする. その後, MTT液を除去し, 生成したフォルマザンをイソプロパノールで可溶化し550 nmの吸光度を測定した.

#### 4. 研究成果

PACAPによって誘導される神経突起伸張作用におけるミトコンドリアの寄与を解明する

ことを目的として実験を遂行した. PACAPはNeuro2a細胞においてミトコンドリアの活性化とともに神経突起の伸長を促進した. これらの結果は海馬由来の初代培養神経細胞においても再現され, MAP2陽性の樹状突起が著明に伸長していることを明らかにした. さらに, いずれの細胞においても, 神経突起の形成促進作用とミトコンドリアの活性化はプロテインキナーゼAの阻害剤であるH89およびERK阻害剤であるPD98059によって阻害された. 一方, Pgc1 $\alpha$ はミトコンドリア活性のマスターレギュレーターとしての機能が報告されているが, PACAPの暴露によってPgc1 $\alpha$ とその下流分子であるシトクロムCおよびシトクロムC酸化酵素サブユニット4の発現が増強された. 続いて, PACAPシグナリングの下流におけるPgc1 $\alpha$ の関与をより詳細に解析するために, Pgc1 $\alpha$ 特異的なsiRNAで同タンパク質のノックダウンを行った細胞における検討を行った. その結果, Pgc1 $\alpha$ のノックダウンにより, PACAPによって誘導されたミトコンドリアの活性化および神経突起の形成促進作用ともに有意に抑制された. また, 雄性成熟マウスにPACAPを6日間投与した後の, 海馬におけるMAP2の発現が有意に増強することを見出した. 以上の結果より, PACAPによる神経突起の形成促進作用はプロテインキナーゼA, ERKとPgc1 $\alpha$ を介したミトコンドリアの活性化を介している可能性が示唆された. 本研究は, PACAPによる神経細胞の分化メカニズムの解明と神経細胞の成長における普遍的なミトコンドリアの役割の理解に寄与した.

一方, cFosは神経活動のマーカーとして知られる転写制御因子で, 核において様々なタンパク質の発現を制御している. しかしながら, 2002年の報告では, カイニン酸を投与したマウスの海馬において, 核のみならず, ミトコンドリアにもその発現が観察されることが明らかになっているが, その機能については明らかではない. そこで, このミトコンドリアでのcFosの機能について, 詳細に検討した.

ミトコンドリアでのcFosの機能を神経系の細胞で詳細に解析するためにNeuro2a細胞を用いて実験を行った. まず, 細胞の活性化にともなうミトコンドリア内cFosの発現を観察するために, インビトロ虚血を負荷した. すると, in vitro虚血の1時間後において, 核のみならずミトコンドリアでもcFosの発現が有意に増強することが明らかとなった. 続いて, シトクロムC酸化酵素サブユニット8のミトコンドリア移行シグナルを融合させ

た cFos を発現させるためのプラスミドベクターを作成した。これらのプラスミドを細胞に導入すると、発現した cFos は選択的にミトコンドリアに集積する事が明らかとなった。ミトコンドリア移行性の cFos を発現させた細胞は、コントロールと比較して細胞の増殖能が 1.5 倍増えたが、in vitro 虚血を負荷すると、より脆弱になることが明らかとなった。

本研究の結果より、ミトコンドリア内の cFos は増殖能と細胞死に影響をあたえることが明らかとなった。過去の報告より、cFos はミトコンドリア DNA と結合できることが報告されており、ミトコンドリア内での転写制御に影響をあたえる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Takenouchi R, Inoue K, Kambe Y, Miyata A. N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis via GPR18. *Biochem Biophys Res Commun.*, 418(2), 2012, 366-371, 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266325>
- (2) Kambe Y, Miyata A. Role of Mitochondrial Activation in PACAP Dependent Neurite Outgrowth. *J Mol Neurosci.*, 48(3), 2012, 550-557, 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460784>
- (3) Fukumori R, Takarada T, Kambe Y, Nakazato R, Fujikawa K, Yoneda Y., Possible involvement of mitochondrial uncoupling protein-2 in cytotoxicity mediated by acquired N-methyl-d-aspartate receptor channels. *Neurochem Int.*, 61, 2012, 498-505, 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22490607>
- (4) Miura A, Odahara N, Tominaga A, Inoue K, Kambe Y, Kurihara T, Miyata A., Regulatory mechanism of PAC1 gene expression via Spl by nerve growth factor in PC12 cells. *FEBS Lett.*, 586, 2012, 1731-1735, 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609358>
- (5) Kambe Y, Nakamichi N, Takarada T, Fukumori R, Nakazato R, Hinoi E, Yoneda Y., A possible pivotal role of

mitochondrial free calcium in neurotoxicity mediated by N-methyl-d-aspartate receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Int.*, 59(1), 2011, 10-20, 査読有り

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669242>

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) Yuki Kambe and Atsuro Miyata, From mitochondria to nucleus, Pgc-1 translocation may be one of the key factors for neurite extension in N2a cells. 40th annual meeting Neuroscience, 2010 年 11 月 13 日~17 日, SanDiego, アメリカ
- (2) 神戸悠輝, 井上和彦, 栗原崇, 宮田篤郎, Neuro2a 細胞の神経突起形成過程における Pgc1 の細胞内輸送によるシグナル伝達機構の解明, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日~24 日(誌上開催), パシフィコ横浜, 横浜
- (3) 三浦綾子, 井上和彦, 神戸悠輝, 栗原崇, 宮田篤郎, PAC1 遺伝子の負の発現調節機序の解析, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日~24 日(誌上開催), パシフィコ横浜, 横浜
- (4) Yuki Kambe, Kazuhiko Inoue, Takashi Kurihara and Atsuro Miyata, Pgc1  $\alpha$  translocation may be one of the key factors for neurite outgrowth in neurons. 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2011 年 8 月 31 日~9 月 4 日, 市民文化ホール, 鹿児島
- (5) Yuki Kambe, Kazuhiko Inoue, Takashi Kurihara and Atsuro Miyata, Intra-cellular translocation of Pgc1  $\alpha$  is involved in PACAP induced neurite outgrowth in neuronal cells, 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 26 日~28 日, 瑠璃光, 石川
- (6) 神戸悠輝, 井上和彦, 栗原崇, 宮田篤郎, PAC1 受容体を介した神経突起形成メカニズムにおけるミトコンドリア機能調節, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 2011 年 11 月 20 日, KKR ホテル博多, 福岡
- (7) Yuki Kambe, Kazuhiko Inoue, Takashi Kurihara, Atsuro Miyata, INVOLVEMENT OF MITOCHONDRIA IN PACAP-PAC1 DEPENDENT NEURITE OUTGROWTH, 10th

International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 2011年12月13日-16日, Hilton Eilat Queen of Sheba Hotel, イスラエル

- (8) 神戸悠輝, 宮田篤郎, PACAPによる神経突起伸展促進作用におけるミトコンドリアの寄与, GPCR研究会, 2012年05月11日, 日本科学未来館 みらいCANホール, 東京
- (9) 神戸悠輝, 宮田篤郎, PACAPによる神経突起伸展促進作用におけるミトコンドリアの寄与, ニューロフォーラム, 2012年07月10日, 鹿児島大学鶴陵会館, 鹿児島
- (10) Yuki Kambe, Atsuro Miyata, Involvement of mitochondria in PACAP dependent neurite outgrowth, Society for Neuroscience, 2012年10月13日~17日, New Orleans at the Ernest N. Morial Convention Center, アメリカ
- (11) Ayako Miura, Yuki Kambe, Kazuhiko Inoue, Takashi Kurihara, Atsuro Miyata, Spl serves pivotal role in negative regulation of PAC1 gene expression by involvement of transglutaminase 2, Society for Neuroscience, 2012年10月13日~17日, New Orleans at the Ernest N. Morial Convention Center, アメリカ
- (12) Manoj Bohara, Yuki Kambe, Takashi Kurihara, Tetsuya Nagayama, Kazunori Arita, Atsuro Miyata, C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE MODULATES THE PERMEABILITY OF BLOOD-BRAIN BARRIER, 第86回日本薬理学会年会, 2013年03月21日~23日, 福岡国際会議場, 福岡

[その他]

ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/pharmaco/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神戸 悠輝 (KAMBE YUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 60549913