

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592119

研究課題名(和文)脳虚血および虚血耐性現象におけるミトコンドリアバイオジェネシスの意義の解明

研究課題名(英文)The roles of mitochondria biogenesis on ischemic neuronal injury and tolerance

研究代表者

木内 博之(KINOUCHI, Hiroyuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：30241623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアはエネルギー産生のみならず、細胞障害においても重要な役割を果たす。また、ミトコンドリアは融合と分裂を頻りに繰り返しながら、形態をダイナミックに変化させていること(ミトコンドリアバイオジェネシス)も明らかとなっており、疾患との関連性が注目されている。本研究では、このようなミトコンドリア障害とバイオジェネシスが虚血性神経細胞障害や虚血耐性現象において果たす役割を検討した。その結果、ミトコンドリアクリステ構造変化に関わるバイオジェネシス関連蛋白質の発現変化が、脳虚血後アポトーシスを誘導するものと考えられた。また、虚血耐性獲得にはミトコンドリア融合の亢進が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play a pivotal role not only in energy production but also in cell death. In addition, recent studies have revealed that mitochondria are remarkably dynamic organelles that migrate, divide and fuse. Much attention has been paid to this phenomenon, called mitochondria biogenesis, in connection with various diseases. In this study, we elucidated the roles of mitochondria injury and biogenesis in ischemic neuronal injury and ischemic tolerance. Our results suggest that the expression change of mitochondria biogenesis related protein would lead apoptosis after ischemia, and mitochondria fusion might be associated with acquisition of ischemic tolerance.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳虚血耐性 ミトコンドリアバイオジェネシス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはエネルギー産生のみならず、細胞障害においても重要な役割を果たす。虚血性神経障害においても、ミトコンドリアは中心的な役割を担い、ミトコンドリア内に存在するアポトーシス関連蛋白質が神経細胞死を誘導することが広く知られている。このアポトーシス誘導の機序は依然として解明されていないが、近年、HS-1 associated protein X-1 (Hax-1)の果たす役割が注目されている。Hax-1はB細胞のシグナル伝達物質として発見されたが、血液系細胞のみならず様々な細胞のミトコンドリアに発現し抗アポトーシス作用を有することが明らかとなっている。種々の疾患におけるこのHax-1の役割が解明されつつあるが、これまで虚血性神経障害における役割は検討されていない。

また、ミトコンドリアが、生細胞の中で融合と分裂を頻繁に繰り返しながら、形態をダイナミックに変化させていることも明らかとなってきている(ミトコンドリアバイオジェネシス)。ミトコンドリアは外膜と内膜により形成され、融合と分裂には、GTP加水分解酵素(GTPase)であるMitofusion 1(MFN1)/MFN2、Dynamine-related protein 1(Drp1)、Optic atrophy 1(OPA1)等が関与している。MFN1/2は外膜に局在し、二つのミトコンドリアを融合する。細胞質と外膜の両者に局在するDrp1は、外膜に存在するFis1と共に分裂に関わる。また、OPA1は膜間腔に存在し、融合および内膜クリステ構造形成に関与する。このようなミトコンドリアバイオジェネシスの意義は、まだ十分に解明されていないが、エネルギー需要に応じて、ミトコンドリアをrenewalし、細胞内の適切な部位に再配置するものと考えられている。また、細胞傷害ストレスにも密接に関与し、分裂は細胞死を誘導し、融合は保護効果を有すると考えられている。更に、GTPaseは、アポトーシス経路や細胞周期蛋白質を介した細胞死発現にも直接関与しており、OPA1はアポトーシス刺激によりクリステ構造を変化させ、cytochrome cを細胞質へ放出する。このOPA1を介したクリステ構造変化には、ミトコンドリア内膜に存在するセリンプロテアーゼであるpresenilin-associated, rhomboid-like (PARL)が関与することが報告されている。以上のようなミトコンドリアバイオジェネシスおよびGTPaseの役割は、様々な病態において検討されるようになってきており、例えば、MFN2の遺伝子変異はCharcot-Marie-Tooth subtype 2Aを、OPA1の遺伝子変異は優性遺伝性視神経萎縮症の原因となることが明らかとなっている。また、アルツハイマー病やパーキンソン病においてもミトコンドリアの融合と分裂の不均衡が発病の原因となる可能性が指摘されている。しかしながら、脳虚血病態においては、未だミトコンドリアバイオジェネシスの役

割は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性神経障害におけるミトコンドリアの役割をミトコンドリアバイオジェネシスに注目して検討し、その新たな機序を解明することである。また、短時間の軽度の虚血負荷は、引き続く致死的虚血負荷に対する虚血耐性現象を誘導するが、この現象におけるミトコンドリアの役割も検討する。具体的には以下の項目につき、研究を行った。

(1) Hax-1の虚血後発現変化と発現に影響を及ぼす機序の解明

(2) PARLとOPA1の虚血後発現変化と虚血性神経細胞傷害における役割

(3) 虚血および虚血耐性現象におけるミトコンドリア形態変化とMfnやDrp1の発現変化

3. 研究の方法

(1) Hax-1の虚血後発現変化と発現に影響を及ぼす機序の解明

虚血モデルは、マウス一過性前脳虚血モデルを使用した。両側総頸動脈22分間の遮断による虚血後3、6、24、72時間で断頭し、線条体の蛋白抽出および薄切切片作成を行った。アポトーシスはTUNEL染色により検出した。Western blotおよび免疫染色を行い、Hax-1発現を解析した。主要な活性酸素産生源であるNADPH oxidase (NOX)のノックアウトマウスを使用し、活性酸素がHax-1発現に及ぼす影響についても検討した。

(2) PARLとOPA1の虚血後発現変化と虚血性神経細胞傷害における役割

虚血モデルは上述と同様のマウス一過性前脳虚血モデルを使用した。両側総頸動脈22分間の遮断による虚血後3、6、24、72時間に線条体を摘出し、抽出した蛋白質は細胞質分画とミトコンドリア分画に分画分けした。Western blotによりPARLとOPA1の発現を解析した。また、PARL-siRNA投与がcytochrome cの細胞質への放出や神経傷害に及ぼす効果を検討した。

(3) 虚血および虚血耐性現象におけるミトコンドリア形態変化とMfnやDrp1の発現変化

虚血および虚血耐性条件下でのミトコンドリアの形態変化は、培養PC12細胞のミトコンドリアをmito-trackerで染色し、検討した。培養細胞に対する疑似虚血条件としては、低酸素低グルコース条件(oxygen glucose deprivation: OGD)を使用した。Preconditioningでは6時間、致死的虚血では15時間のOGDを負荷した。

MfnとDrp1の発現変化はラット一過性前脳虚血モデルのサンプルで解析した。脱血により平均動脈血圧を30-35 mmHgに低下させた

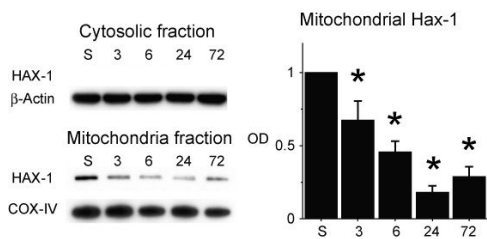
状態で両側総頸動脈を5分間遮断し、前脳虚血を作成した。虚血耐性モデルでは、3分間の両側総頸動脈遮断により preconditioning を行い、その2日後に5分間の致死性虚血を負荷した。虚血後1、8、24、72、120時間に海馬CA1を摘出し、蛋白抽出を行い、western blot で発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Hax-1 の虚血後発現変化と発現に影響を及ぼす機序の解明

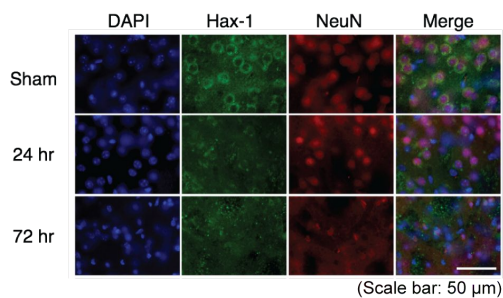
[結果]

Western blot 解析では、HAX-1 はミトコンドリア分画に発現を認め、虚血後3時間よりその発現が徐々に低下し、虚血後6-72時間で有意差をもって減少した(図1)。一方、細胞質分画での Hax-1 の発現は虚血後も認めなかった。



(図1) 脳虚血後 Hax-1 発現変化 (* p<0.05 vs sham)

蛍光二重免疫染色では、HAX-1 は非虚血下で NeuN (神経細胞マーカー) と共発現した。虚血後には、Hax-1 の発現低下を認め、western blot の結果と一致していた(図2)。また、虚血後24時間には TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞の発現を認めたが、Hax-1 陽性細胞では TUNEL 染色は陰性だった。



(図2) 二重免疫染色 (Hax-1・NeuN)

また、NADPH oxidase ノックアウトマウスでは、Hax-1 の虚血後発現低下が有意に抑制されていた。

[考察]

以上より、新規ミトコンドリア蛋白質である Hax-1 の発現低下が虚血後アポトーシスを誘導する可能性が示唆された。Hax-1 の、抗アポトーシス効果の機序として、1) ミトコンドリア膜ポテンシャルの維持、2)

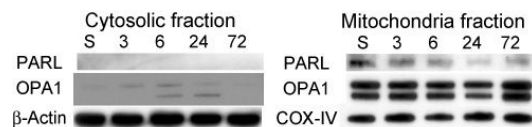
Caspase-9 の活性化阻害、3) 抗アポトーシス蛋白質 high temperature requirement factor A2 (HtrA2) の活性化が挙げられている。虚血後に Hax-1 のこれらの効果が減弱することにより、アポトーシスが誘導されるものと考えられたが、今回の検討では十分にその機序は解明されておらず、これは今後の課題である。

本研究結果より、Hax-1 の発現低下には NADPH oxidase により産生される活性酸素が関与するものと考えられた。近年、NADPH oxidase が産生する活性酸素がミトコンドリアからの apoptosis inducing factor の放出を促すことが報告されており、NADPH oxidase の産生する活性酸素とミトコンドリアの相互作用を示す興味深い結果と思われた。

(2) PARL と OPA1 の虚血後発現変化と虚血性神経細胞傷害における役割

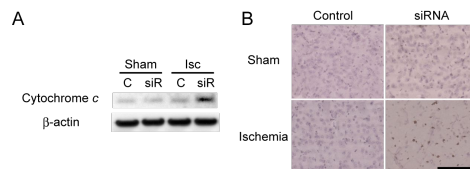
[結果]

Western blot 解析では、PARL はミトコンドリアのみに発現を認め、虚血後6-72時間には、この発現が減弱した。虚血後にも PARL の細胞質分画での発現は認めなかった。一方、OPA1 も非虚血下ではミトコンドリアのみに発現を認めたが、虚血後6-24時間にはミトコンドリアでの発現が減弱し、また虚血後3-24時間では細胞質分画での発現を認めた(図3)。



(図3) 脳虚血後の PARL と OPA1 の発現変化

PARL-siRNA 投与群では、control 投与群と比較し、虚血24時間後の cytochrome c の細胞質への放出が有意に亢進していた。また、PARL-siRNA 投与群では、虚血後の TUNEL 陽性細胞が control 投与群に比べ増加した(図4)。



(図4) (A) 脳虚血後24時間での細胞質分画の cytochrome c 発現変化 (C: control, siR: PARL siRNA 投与群)。 (B) 虚血3日後切片の TUNEL 染色写真。 Scale bar: 100 μm。

[考察]

PARL ノックアウト細胞のミトコンドリアでは、アポトーシスに伴うクリステ構造変化や cytochrome c の細胞質への放出が促進されることが報告されている。本研究でも、

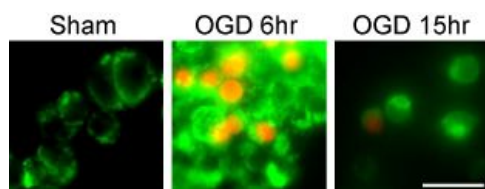
PARL-siRNA 投与群では cytochrome c の細胞質への放出が亢進し、アポトーシスが促進されており、先行する研究結果と一致する。脳虚血後には PARL の発現が低下したが、これがクリステ構造変化や cytochrome c の細胞質への放出を惹起し、神経細胞死が誘導されるものと考えられた。

一方、前述の如く OPA1 もクリステ構造形成に關与し、cytochrome c をミトコンドリア膜間腔にとどめる働きをしていると考えられている。アポトーシス刺激に際しては、OPA1 が細胞質へ放出されると共に、このクリステ構造が変化し、cytochrome c が細胞質へ放出され、アポトーシス経路が活性化される。脳虚血でも同様に、OPA1 の細胞質への放出がミトコンドリア障害のトリガーとなることが本研究結果から予想された。

上述の PARL ノックアウト細胞の脆弱性は、OPA1 のプロセッシング障害に伴う、クリスタ構造の変化が原因の一つとされている。本研究では PARL と OPA1 の直接の相互作用は検討されておらず、この解明が今後の課題である。

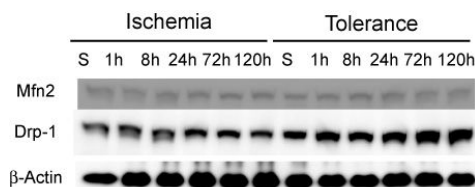
(3) 虚血および虚血耐性現象におけるミトコンドリア形態変化と Mfn/Drp1 の発現変化 [結果]

Preconditioning 条件後と致死虚血条件後の PC12 細胞でのミトコンドリアの形態変化を mito-tracker 染色で検討した。Preconditioning された PC12 細胞のミトコンドリアは、sham condition のミトコンドリアと比較して膨化しており、ミトコンドリア融合が亢進していることが示唆された。一方、致死虚血条件後には、このようなミトコンドリアの形態変化は消失していた (図 5)。



(図 5) PC12 細胞 OGD 後 Mito-tracker 染色。Scale bar : 10 um。

脳サンプルの western blot 解析では、Mfn と Drp1 は虚血後および虚血耐性獲得後にも明らかな発現変化を示さなかった (図 6)。(図 6) 脳虚血および虚血耐性脳での Mfn と



Drp-1 の発現変化

[考察]

本研究からは、脳虚血耐性への preconditioning 後には、ミトコンドリア融合が亢進していることが示唆された。ミトコンドリアバイオジェネシスの意義は十分に解明されていないものの、ミトコンドリア融合は保護効果を有すると考えられており、この保護効果が虚血耐性現象に寄与している可能性が示唆された。更なる詳細な形態学的検討に向け、今後は電子顕微鏡による検討を追加する予定である。今回の検討では、Mfn や Drp1 の発現は虚血後および虚血耐性獲得後にも明らかな変化が見られなかったが、虚血耐性現象でのミトコンドリア融合の分子生物学的機序の解明も今後の課題の一つである。

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 1 件)

Yoshioka H, Katsu M, Sakata H, Okami N, Wakai T, Kinouchi H, Chan PH.: The role of PARL and HtrA2 in striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 33: 1658-1665, 2013 (査読有り)

[学会発表](計 7 件)

Yoshioka H, Yagi T, Wakai T, Hashimoto K, Chan PH, Kinouchi H: Role of PARL/HtrA2 pathway in striatal neuronal injury after global cerebral ischemia. Brain 2013, Shanghai (China), May 23, 2013

Yoshioka H, Wakai T, Yagi T, Fukumoto Y, Hashimoto K, Horikoshi T, Kinouchi H: Neuroprotective Effects of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonist in Transient Forebrain Ischemia. Brain 2013, Shanghai (China), May 23, 2013

Yoshioka H, Yagi T, Wakai T, Fukumoto Y, Chan PH, Kinouchi H: Roles of PARL and HtrA2 in striatal neuronal injury after global ischemia. 6th Korea-Japan Joint Stroke Conference, Knowledge Capital (Kita-ku, Osaka), Oct 6, 2013

吉岡秀幸、八木貴、若井卓馬、福元雄一郎、堀越徹、Pak H. Chan、木内博之: 一過性前脳虚血における Hax-1 の発現変化. 第 14 回日本分子脳神経外科学会. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2013 年 10 月 18 日

吉岡秀幸、八木貴、若井卓馬、福元雄一郎、Pak H. Chan、木内博之: 虚血性神経細胞障害における HtrA2 および PARL の役割.

第 25 回日本循環代謝学会総会．京王プラザ
ホテル札幌（北海道・札幌市）．2013 年 11 月
2 日

吉岡秀幸、八木貴、若井卓馬、福元雄一
郎、金丸和也、Pak H Chan、木内博之：一過
性前脳虚血における Hax-1 の発現変化．第 26
回日本脳循環代謝学会総会．岡山コンベン
ションセンター（岡山県・岡山市）．2014 年
11 月 21 日

吉岡秀幸、嘉津政隆、坂田洋之、岡見修
哉、若井卓馬、木内博之、Pak H Chan：The Role
of PARL and HtrA2 in Striatal Neuronal
Injury after Transient Global Cerebral
Ischemia．第 15 回日本分子脳神経外科学会．
大手門パルズ（山形県・山形市）．2014 年 9
月 14 日

〔図書〕（計 2 件）

吉岡秀幸、木内博之．脳虚血のニューロ
サイエンス．清水宏明編：脳神経外科診療プ
ラクティス．脳血管障害の急性期マネージ
メント．P10-14、2014、文光堂

吉岡秀幸、木内博之：Heat shock protein
family と脳虚血病態．日本臨床 最新臨床脳
卒中学（上）最新の診断と治療．P428-432、
2014、日本臨床社

6．研究組織

(1)研究代表者

木内 博之（KINOUCHI, Hiroyuki）
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：30241623

(2)研究分担者

吉岡 秀幸（YOSHIOKA, Hideyuki）
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：20402076

八木 貴（YAGI, Takashi）
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：90345702