

表 題 神経発生過程におけるミトコンドリアの役割について

論文の区分 課程博士

著 者 名 黒田 林太郎

担当指導教員氏名 川合 謙介 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学
専攻分野 精神・神経・筋骨格疾患学
専攻科 脳神経外科

2021年1月8日申請の学位論文

目次

序論.....	1
1) 神経活動とミトコンドリア	1
2) 神経発生とミトコンドリア	2
3) Mitochondrial transcription factor A (TFAM)	4
目的.....	6
方法.....	7
1) マウス	7
2) ニューロスフェア培養法	8
3) ニューロスフェア形成能測定.....	9
4) BrdU 取り込み試験	9
5) 神経分化試験	10
6) 組織切片作成	11
7) 免疫組織染色	11
8) Golgi 染色	12
9) 脳からの DNA 抽出、RNA 抽出と cDNA 作成.....	13
10) 定量 PCR (quantitative PCR).....	13
11) 細胞外フラックスアナライザー	15
12) フローサイトメトリー (FCM)	16
13) 透過型電子顕微鏡	16
14) ウェスタンブロッティング	17
15) 統計処理.....	18
結果.....	19
1) Tfam cKO マウスは出生しある程度成長するがその後死亡する	19
2) Tfam cKO マウス由来の神経幹細胞／前駆細胞は、増殖能および神経分化能が低下し、mtDNA の遺伝子発現が低下している	29
3) Tfam cKO 細胞ではミトコンドリア機能が変化している	35
4) Tfam cKO 脳では神経細胞のミトコンドリアの形態学的異常と電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体成分の発現低下がみられる	40

5) アポトーシスは神経発生の初期には起こらず、Tfam cKO 大脳皮質ではミクログリアの活性化が先行する	46
6) ミトコンドリアの機能異常により Integrated stress response (ISR) が <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で誘導される	53
考察.....	56
本研究の限界と課題.....	62
終論.....	63
謝辞.....	64
引用文献.....	65

序論

1) 神経活動とミトコンドリア

神経活動には大量のエネルギーを必要とし、その正常な維持にミトコンドリア機能が重要である。ミトコンドリア脳筋症に代表されるようなミトコンドリア病のみならず、神経変性疾患や加齢に伴う神経障害、認知症など多くの神経疾患でミトコンドリア機能に異常が認められることから、正常な神経機能の発現には適切なミトコンドリア機能維持が必須であると考えられる。

ミトコンドリアは、エネルギー需要に応じて酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation: OXPHOS) により ATP を生成し、細胞内のエネルギー代謝に貢献している非常にダイナミックな小器官である¹。近年、ミトコンドリアで生成される中間代謝物や活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) が、細胞のシグナル伝達や遺伝子発現制御に大きな役割を果たしていることが明らかになってきている^{2,4}。ミトコンドリアはこれまで、細胞内のエネルギー産生を担うオルガネラとして認識されてきたが、それに加え近年は、代謝物や活性酸素の産生を介してシグナルの発信や細胞内高次機能の制御に関与する事例が種々報告されている。

正常なミトコンドリアは、細胞の状況に応じて分裂と融合を繰り返しており、これまで考えられていたよりもダイナミックな細胞内小器官である。細胞

のエネルギー要求に応じてミトコンドリアの分裂／融合とそれに続くエネルギー産生が厳密に制御されており、その制御の破綻によりミトコンドリアは機能不全に陥り、過剰な活性酸素の産生や ATP 産生の減少をもたらす。ミトコンドリア機能不全は、多くの疾患の進行や病態、加齢に伴う疾患の進行に深く関係している^{5,6}。したがって、ミトコンドリアがどのように正常に維持されているのかを解明することは重要な研究課題である。

2) 神経発生とミトコンドリア

これまで成熟神経細胞におけるミトコンドリアによる ATP 産生に関する多くの報告があるが、神経発生や脳の発達過程でのミトコンドリア機能に関してはあまり知られていない。神経細胞の発生は、対称性分裂により増殖する神経幹細胞を維持しつつ、神経幹細胞が非対称性分裂により前駆細胞を経て神経細胞やグリア細胞へと分化することで成し遂げられる。哺乳類の脳皮質は、分化した神経細胞が脳内の適切な場所に遊走していくことで適切な層構造を形成する。

神経発生過程のミトコンドリアは、分裂と融合によりダイナミックに調節され、維持されていることが知られているが、個体発生時や成体脳の神経発生におけるミトコンドリアの活性化や機能に関してはほとんど明らかになっていな

い。神経発生が活発な胎生期のみならず成体脳にも神経幹細胞が存在し、個体の一生を通じて機能的な神経を生み出している。幹細胞は解糖系優位で電子伝達系により ATP 産生を行うミトコンドリアは抑制されていると一般的に考えられている。しかしながら、神経幹細胞におけるミトコンドリアの維持機構や神経分化にともなう代謝リプログラミングの分子機構に関しては不明な点が多い。

神経発生過程では、神経幹細胞 (neural stem cells: NSC) は自己複製によって維持されつつ、時間経過と共に神経細胞系とグリア細胞系へと分化していく⁷⁻⁹。ミトコンドリアは分裂・融合サイクルを介してダイナミックに調節されており、ミトコンドリアの形状と活性やミトコンドリアの果たす役割は神経発生期の段階と細胞系列に大きく関連していると考えられる¹⁰⁻¹³。ミトコンドリアの活動による ATP 産生は神経細胞の機能維持に重要であり、ミトコンドリア疾患患者の神経細胞の活動は深刻な影響を受けている¹⁴⁻¹⁷。ミトコンドリアの維持やミトコンドリアの形態が神経発生の全過程でダイナミックに制御されていることは知られているが、各段階におけるミトコンドリア活動の必要性や依存性については、未だほとんど知られていない。

神経発生過程におけるミトコンドリアの果たす役割についての知見を得ることは、神経変性疾患や神経の加齢性変化などの病態へ迫る上での一石となりうると考えられる。

3) Mitochondrial transcription factor A (TFAM)

ミトコンドリアは哺乳類細胞中に数百存在し、それぞれ平均 5 個程度のミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA: mtDNA) を有している。mtDNA は環状構造をしており、電子伝達系に関するタンパク質の一部をコードしている。すなわち、ミトコンドリア内膜にある電子伝達系の複合体 I ~ V のうち II 以外は、mtDNA コードの成分と核 DNA (nuclear DNA: nDNA) コードの成分で構成されている。

神経発生におけるミトコンドリア機能を解明するためには、神経発生過程でミトコンドリア活性を低下させたマウスを解析することが有用である。ミトコンドリア機能低下モデルを作出するにあたって、本研究ではミトコンドリア転写因子 A (Mitochondrial transcription factor A: TFAM) をターゲットとした。

TFAM は mtDNA の転写や維持に必須である。従って、TFAM の欠損により mtDNA が維持できなくなり、人為的にミトコンドリア機能を低下させることが可能である。

TFAM は nDNA にコードされており、mtDNA のコピー数の維持、ヌクレオイドと呼ばれる mtDNA 特有の構造の維持、また mtDNA の転写と複製にも不可欠である^{17,18}。TFAM の発現量と mtDNA のコピー数の間には強い正の相関があることが知られている。したがって、ミトコンドリアの活性はミトコンドリア内に存在する TFAM の量に強く影響される。全身性の TFAM ノックアウトマウスは胎齢 8.5 日ごろに致死となり、種々の条件付き TFAM ノックアウトマウスは、TFAM の枯渇に伴う mtDNA の低下によりミトコンドリア活性が低下する。したがって、TFAM ノックアウトマウスを用いることは、種々の細胞や組織、また種々の生命活動におけるミトコンドリアの役割を研究するのに適していると考えられる。神経細胞特異的 CaMK II-Cre マウスを用いたマウスの前脳神経細胞における TFAM の欠損は、ミトコンドリア遅延型神経変性（mitochondrial late-onset neurodegeneration : MILON）の表現型を示した¹⁹。MILON マウスでは終末期や興奮ストレス下での大量の神経細胞死が検出されたことから、このマウスモデルから神経細胞の活動を正常に維持するためにはミトコンドリアの活性が重要であることが明らかとなった。

目的

個体発生時や成体脳の神経発生におけるミトコンドリアの活性化や機能を明らかにするために、ミトコンドリアの活性維持に必須である **TFAM** を神経幹細胞特異的に欠損したマウスモデルを解析する。神経幹細胞特異的にミトコンドリア機能を低下させ、神経幹細胞の自己複製能や神経分化への影響を細胞レベル及び個体レベルで解析する。幹細胞は解糖系優位で電子伝達系により **ATP** 産生を行うミトコンドリアは抑制されていると一般的に考えられている。本研究では、ミトコンドリア機能低下を引き起こすマウスモデルを用いて、神経発生過程におけるミトコンドリアの役割を明らかにする。

方法

1) マウス

神経幹細胞で *Tfam* 遺伝子を特異的にノックアウトした C57BL/6 マウスを用いた²⁰。Nestin は神経幹細胞マーカーとして知られており、マウスの胎齢 11.5 日目 (E11.5) 以降の神経幹細胞で発現している²¹。Tfam flox をホモに持つ雌 (*Tfam^{fl/fl}*) と *Tfam^{fl/+};Nestin-Cre⁺* の雄を交配し、神経幹細胞で *Tfam* 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した (*Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre⁺* 以下、*Tfam* cKO と表記)。すべての実験は、*Tfam* cKO マウスおよび同腹のマウスをコントロールとして用いて行った。

精巣で Cre 組換え酵素を発現する *Stra8-iCre* (improved-Cre) マウスを用いて、全身性に *Tfam* を欠損したマウスを作製した²²。*Tfam^{fl/fl}* の雌と *Stra8-iCre⁺* の雄を掛け合わせることで、精巣でのみ *Tfam^{fl/-}* となる雄マウスを作製し、さらに *Tfam^{fl/fl}* 雌マウスと掛け合わせた。これにより産出された *Tfam^{fl/-}* 雌マウスと *Tfam^{fl/+};Nestin-Cre⁺* 雄マウスを交配し、*Tfam^{fl/-};Nestin-Cre⁺* マウスを作製した。

すべてのマウスは標準的なマウス飼料と水を自由に利用でき、12 時間明暗サイクルのサーカディアンリズムに従って管理された環境下で飼育維持された。すべての動物実験は、自治医科大学の施設動物実験委員会の承認を受け、文部

科学省所管の学術研究機関における動物実験等の適正な実施のための施設規則及び基本指針に基づき、人道的な方法で実施された。

2) ニューロスフェア培養法

神経幹細胞の増殖能や分化能を *in vitro* で解析するために、ニューロスフェアを作製した^{23,24}。胎齢 14.5 日の雌マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、1xHanks 液の中で胎仔を摘出した。遺伝子型判定のため各胎児の尾を回収し、DNA 抽出を行った。脳を回収後、前脳（大脳皮質 [cortex] または大脳基底核隆起 [ganglionic eminence]）を摘出し、P1000 マイクロピペットで細胞を分散した後に 40- μ m ストレイナーを通過させ単一細胞を調整した。分散した細胞を計数し、 1×10^6 個の細胞を、60-mm の低接着性培養ディッシュ PrimeSurface (Sumilon) へ播種した。用いた神経幹細胞増殖培地は、神経基本培地 (NeuroBasal Medium) に 2% B-27 (ビタミン A 不含)、2 mM グルタミン、20 ng/ml rhEGF、10 ng/ml rhFGF2 を添加しており、細胞は 5% CO₂ にコントロールされた培養器で培養した。4-5 日間培養すると、多分化能を保持したまま細胞が集積して増殖し、球形の集塊すなわちニューロスフェアが形成された。これは主に神経幹細胞及び神経前駆細胞により構成される。必要に応じて継代し、以後の *in vitro* での解析に用いた。

3) ニューロスフェア形成能測定

初代培養で得られたニューロスフェアを Accumax で室温で 10 分間処理した後、P1000 マイクロピペットで分散し単細胞とした。分散した細胞を計数し、Ultra-Low Attachment Surface 96-well plate (Corning) へウェル当たり 1,000 細胞ずつ播種して神経幹細胞培地で 10 日間培養した。形成されたニューロスフェアの大きさと数を KEYENCE BZ-X700 顕微鏡下で計数し、大きさごとに分類することで、ニューロスフェア形成能を測定した。

4) BrdU 取り込み試験

初代培養で得られたニューロスフェアを分散させて単一細胞とし、細胞接着を促進させるため前日から 12-well plate (Iwaki) 内で poly-L-オルニチンコーティング処理し当日 PBS で洗浄したカバーガラス上へ 2×10^5 細胞ずつ播種し、神経幹細胞増殖培地で一晩培養した。細胞を $10 \mu\text{M}$ BrdU を添加した神経幹細胞増殖培地で 2 時間培養した後、70%エタノールで 20 分間固定し、2.5N HCl で 20 分間処理し、PBS で十分に洗浄した。5%ウシ胎仔血清 (FBS) /0.1% Triton X-100 を含む生理食塩水 (PBS) でブロッキングを行い、抗 BrdU 抗体(1:200 BD Sciences 347580)を 4°C で一晩反応させた。二次抗体

(AlexaFluor488 1:1000 ThermoFisher)を 1 時間室温で反応させ、DAPI で核染色を行い、マウント剤 (ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen)) でスライドガラスへマウントし、蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700) で観察・定量した。画像解析・細胞数の測定は Cell Analyzer (Keyence)で行った。

5) 神経分化試験

初代培養で得られたニューロスフェアを単一細胞へ分散した後、poly-L-オルニチン処理したカバーガラスを入れた 12-well plate (Iwaki) へ 2×10^5 細胞ずつ播種し、7 日間培養した。用いた神経分化培地には、神経基本培地に 2 % B-27 (ビタミン A 含)、2 mM グルタミン、1 % FBS を添加した。4 % パラホルムアルデヒド (PFA) で細胞を 10 分間固定し、5 % FBS/0.1% Triton X-100 を含む PBS で 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体を反応させた。一次抗体は Tuj1/beta-III Tubulin (1:2000 Abcam ab1820) と GFAP (1:1000 Sigma G3893) を用いた。4°C で一晩反応させ、翌日二次抗体 (AlexaFluor488 1:1000 ThermoFisher, Cy3 1:1000 Amersham Pharmacia) を室温で 1 時間反応させ、DAPI で核染色した後、カバーガラスをスライドガラスへマウント (ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen)) した。観察は KEYENCE

BZ-X700 顕微鏡で行い、画像解析及び計数は Cell Analyzer (Keyence)で行った。

6) 組織切片作成

日齢 0、4、8 または 9 (P0、P4、P8 または P9) のマウスから脳を摘出して組織切片を作成した。マウス腹腔内にペントバルビタールを注射して麻酔し、開胸して右心房を切開して脱血し、左心室から 4% PFA を含む PBS を十分量注入して灌流固定を行った。脳を摘出し、4% PFA で一晩、その後 20% ショ糖液で数日間浸漬した。その後、OCT コンパウンドへ包埋し、-80℃で凍結した。クライオスタット(Lica CM-3050S)を使用して 14 μm の厚さで脳の冠状凍結切片を作製し、切片は接着性スライドガラス(Matsunami MAS-01)へ接着させた。ヘマトキシ・エオジン (HE) 染色は通常のプロトールに従った。

7) 免疫組織染色

組織切片を 10 mM クエン酸 (pH6.0) 中で、オートクレーブを用いて 105℃ で 5 分間熱処理し、その後室温で 30 分間置くことで抗原賦活化を行った。PBS で洗浄し、0.2% Triton X-100 を含む PBS で透過処理を行い、5% FBS/0.1% Triton X-100 を含む PBS でブロッキングを行った。一次抗体は 4℃

で一晩（または抗体によっては室温で1時間）処理した。核染色には DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) を使用した。切片は、ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) でマウントし、画像は KEYENCE BZ-X700 顕微鏡で撮影した。画像解析は、Cell Analyzer (Keyence) を用いて行った。使用した抗体は以下の通りである ; MAP2 (1:250、Proteintech 17490-1-AP)、Cux1 (1:500 Santa Cruz sc-13024)、Ctip2 (1:1000 Abcam ab18465)、Pax6 (1:1000 MBL PD022)、Tbr2 (1:1000 Abcam ab183991)、activated caspase3 (1:1000 CST 9665)、Iba1 (1:1000 Abcam ab178846)、GFAP (1:500 Sigma G3893)。

8) Golgi 染色

神経軸索の伸長と神経突起の形成を観察するため、神経細胞体および神経線維の染色を Golgi 染色で行った。Super Golgi kit (Bioenno Tech, LLC) を使用し、方法はキットのマニュアルに従った。P10 あるいは P8 のマウスを麻酔後に開胸し、右心房を切開して脱血し、左心室から PBS で灌流し、脳を摘出後、固定液で7日間浸漬した。ビブラトームを用いて 100 μm の厚さで冠状断の脳切片を作製し、マニュアルに従って染色した。切片は、ProLong Gold

antifade reagent (Invitrogen) で接着性スライドガラス(Matsunami MAS-01)にマウントし、画像は KEYENCE BZ-X700 顕微鏡で撮影した。

9) 脳からの DNA 抽出、RNA 抽出と cDNA 作成

P0, P4, P8 マウスを断頭により安楽死させ速やかに脳を摘出後、大脳を3つのパートに分けて(左右と右前後)、液体窒素下で急速凍結し-80°Cで保存した。

凍結した脳の一部から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いてマニュアルに基づいて DNA を抽出した。

凍結した脳組織の一部を使用し、Trizol 試薬を加えて 21 ゲージ針でホモジナイズして RNA 抽出した。調製した RNA をヌクレアーゼフリーの水に溶解した。総 RNA (1 µg) を用いて、PrimeScript RT 試薬キット (TaKaRa) を用いて cDNA を作成した。

10) 定量 PCR (quantitative PCR)

定量 PCR (qPCR) は、Thunderbird SYBR (東洋紡) もしくは Thunderbird Next SYBR (東洋紡) と Thermal Cycler Dice Real Time System II

(TaKaRa) を用いて行った。脳から抽出した DNA 10 ng を用いて mtDNA を

増幅し、18S リボソーム RNA をコードする核遺伝子で補正することにより、コピー数の相対定量とした。使用したプライマーを表 1 に示した。

脳由来の RNA から作製した cDNA を用いて qRT-PCR を行った。すべてのプライマー配列のリストを表 2 に示した。

各遺伝子の相対発現量は β アクチンの発現量で補正し、 $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて算出した。

表 1. mtDNA コピー数定量に使用したプライマー

Target gene	Forward primer	Reverse primer
mtDNA	TCCCAGACATACTAGGAGAC	ATTAAGGCTAGGACACCTCC
18S rRNA	AGAGGGACAAGTGGCGTTC	CGCTGAGCCAGTCAGTGT

表 2. qRT-PCR に使用したプライマー

Target gene	Forward primer	Reverse primer
TFAM	CAAAGGATGATTTCGGCTCAG	AAGCTGAATATATGCCTGCTTTTC
ND4	CTAATAATCGCACATGGCCTC	CGTAGTTGGAGTTTGCTAGG
ND6	AAAACGATCCACCAAACCT	GGTTAGCATTAAAGCCTTCACC
Cyb	CCATTCTACGCTCAATCCCA	AGGCTTCGTTGCTTTGAGGTA
Co1	ACACAACCTTCTTTGATCCCG	AGAATCAGAACAGATGCTGG
Atp6	CCTTCAATCCTATTCCCATCC	GTTGGAAAGAATGGAGACGG
Pgc1 α	AGCCGTGACCACTGACAACGAG	GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG
Ndufs1	AGGATATGTTTCGCACAACTGG	TCATGGTAACAGAATCGAGGGA
Sdha	GGAACACTCCAAAAACAGACCT	CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA
Sdhc	GCTGCGTTCTTGCTGAGACA	ATCTCCTCCTTAGCTGTGGTT
Cyc1	CAGCTTCCATTGCGGACAC	GGCACTCACGGCAGAATGAA
Cox4	ATGTCACGATGCTGTCTGCC	GTGCCCTGTTTCATCTCGGC
Atp5 β	GCAAGGCAGGGACAGCAGA	CCCAAGGTCTCAGGACCAACA
IL-1 β	CTGTGACTCATGGGATGATGATG	CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG

IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF α	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
Ccl2	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
FGF21	CTGCTGGGGGTCTACCAAG	CTGCGCCTACCACTGTTCC
Asns	CACAAGGCGCTACAGCAAC	CCAGCATAACAGATGGTTTTCTCG
Ddit3	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
Trib3	GCAAAGCGGCTGATGTCTG	AGAGTCGTGGAATGGGTATCTG

1 1) 細胞外フラックスアナライザー

細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XFp, Agilent) を使用した。初代培養により形成されたニューロスフェアを単一細胞に分散させ、ウェルあたり 2×10^3 細胞を、poly-L-オルニチンでコーティングした細胞外フラックスアナライザー解析プレートへ播種し、神経幹細胞増殖培地で一晚培養した。翌日、10 mM グルコース、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および 2 mM グルタミンを含む XF 基本培地に交換し、プレートを CO₂ コントロールのない培養器で 1 時間培養した。ミトストレステストは、細胞にオリゴマイシン (2 μ M)、Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 1 μ M)、およびロテノン/アンチマイシン A 混合物 (各々 0.5 μ M) を順次投与し、酸素消費率 (Oxygen consumption rate, OCR) および細胞外酸性化率 (Extracellular acidification rate, ECAR) を測定した。

1 2) フローサイトメトリー (FCM)

ニューロスフェアを分散させた単一細胞を、poly-L-オルニチンでコーティングした6ウェルプレートへウェルにつき 1×10^6 細胞を播種し、一晩培養した。

解析の当日、ミトコンドリア由来 ROS を検出する MitoSox Red $5 \mu\text{M}$ を培地に添加し、 37°C で 15 分間反応させた。Accumax を用いて細胞を回収し、1 x

Hanks で 1 回洗浄し、0.5 mL の神経幹細胞増殖培地に懸濁させた。FCM 解析を行う直前に、細胞を $40 \mu\text{m}$ セルストレーナーに通過させ、凝集した細胞を除去した。FCM 解析は BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) を用いた。

FSC-H、SSC-H を用いて死細胞などをゲーティングで除去し、10,000 イベントを測定し、データ取得した。データは FlowJo (FlowJo LLC) を用いて解析

した。陽性コントロールとして $10 \mu\text{M}$ アンチマイシン A でコントロール細胞を処理した細胞を使用した。同様の試験を、細胞全体から産生される ROS を

検出する DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を用いて行い、陽性コントロールとして $1,000 \mu\text{M}$ H_2O_2 で処理した細胞を用いた。

1 3) 透過型電子顕微鏡

ミトコンドリアを観察すべく摘出した脳組織からブロックを作成して透過型電子顕微鏡による観察を行った。P10、P8 のマウスを、0.01% ペントバルビタ

ールを用いて麻酔し、開胸して右心房を切開して脱血しながら左心室へ 0.1 M PBS を 7 から 10 ml 注入して灌流した後、7 から 10 ml の 4%PFA/2.5%グルタルアルデヒド (GA) を含む 0.1 M PBS (固定液) で灌流固定した。脳を摘出し、切片作製の準備ができるまで固定液に浸漬した。ビブラトームで脳を 500 μm の厚さに細切し、1% OsO_4 を含む 0.1M PBS 溶液で 90 分間固定し、エタノールで脱水後、サンプルをエポキシ樹脂に包埋し、70 nm の厚さで薄切した。切片は 2% uranyl acetate と Reynolds lead citrate を用いたダブルコントラスト法で染色し、日立 HT7700 透過型電子顕微鏡(日立)を用いて解析した。大脳皮質第 V 層の錐体細胞を中心に観察した。

1 4) ウェスタンブロッティング

細胞、または脳から細胞抽出液を調整するために、プロテアーゼ阻害剤 (Calbiochem) を添加した RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) を用いた。ベンゾナーゼヌクレアーゼ (Novagen) を用いて室温で 5 分間処理した後、30 秒間超音波処理した。細胞抽出液を 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し、不溶物を除去した。タンパク質を 10%PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。膜は、2%FBS、0.5%スキムミルク、0.05%

tween 20 を含む PBS (PBST) でブロッキングし、種々の抗体を、4°C 一晩、もしくは室温 1 時間で反応させた。膜を化学発光検出試薬 ECL (GE Healthcare) で反応させ、目的のタンパク質は LAS4000 mini Luminescent Image Analyzer (GE Healthcare) で検出した。定量は Image Quant (GE Healthcare) を用いて行った。使用した抗体は以下の通りである : NDUFA9 (1:250 Abcam ab14713)、SDHA (1:1000 Molecular Probe A-11142)、UQCRC2 (1:500 Abcam ab14745)、ATP5 α (1:1000 Molecular Probe A-11144)、VDAC1/Porin (1:800 Abcam ab15895)、ATF4 (1:1000 CST 11815)、 β actin (1:1000 MBL M177-3)。

15) 統計処理

統計処理はエクセル統計を用いて t 検定の両側検定で行い、p 値は **p<0.01 もしくは *p<0.05 をもって有意とした。

結果

1) Tfam cKO マウスは出生しある程度成長するがその後死亡する

今回使用したマウスの交配計画では、 $Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre^+$ 、 $Tfam^{fl/+};Nestin-Cre^+$ 、 $Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre^-$ 、 $Tfam^{fl/+};Nestin-Cre^-$ の遺伝子型を持つ4種類のマウスが生まれると推定される。全ての遺伝子型のマウスがメンデルの法則に従って出生したことから、Tfam cKO ($Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre^+$) マウスは胎生致死ではないことが分かった。また、出生直後に窒息や摂餌不良・育児放棄などで死亡する個体もあったが、遺伝子型によらずランダムだった。Tfam cKO マウスは出生時点では大きさや行動などに同腹のマウスとは区別ができなかった。 $Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre^-$ マウスと $Tfam^{fl/+};Nestin-Cre^-$ マウスは外見や各種検査結果でも全く差異が認められず、コントロールマウスとして使用した。

$Tfam^{fl/+};Nestin-Cre^+$ マウスはヘテロ接合体であり、出生時の外見やその後の成長、組織学的解析結果はコントロールと同様であったが、生化学的解析において mtDNA 量などが Tfam cKO とコントロールの中間の値を示したため、今回の解析には使用しなかった。

Tfam cKO マウスは生後急速に成長が遅延し、その差は P4 以降に明らかとなった。Tfam cKO マウスは P4 以降から体重が増加せず、P6 以降では同腹の

コントロールマウスと比較して体重は著明に小さく、P10 ごろに全例死亡した。P9 マウスの全身像と摘出脳をそれぞれ比較すると、Tfam cKO マウスはコントロールマウスに比べ著しく小さかった (図 1)。

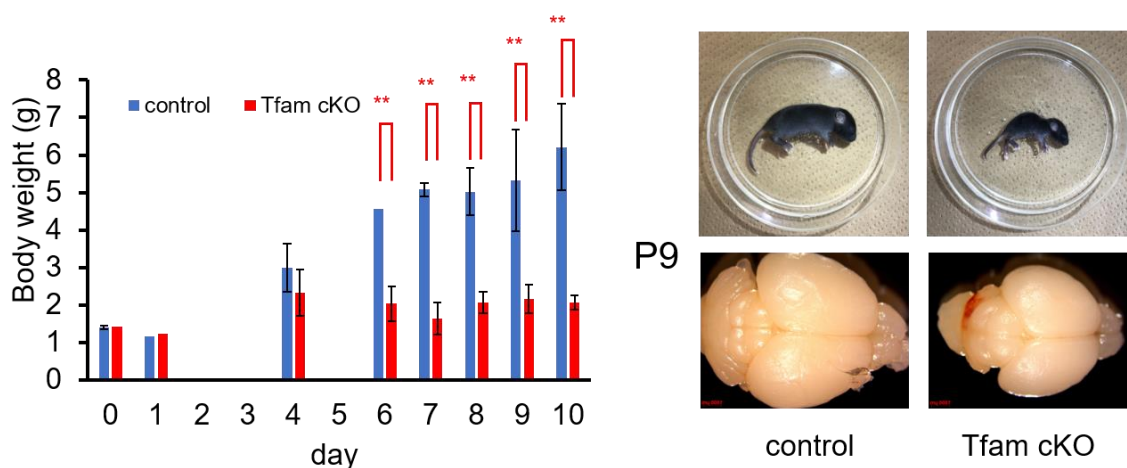


図 1 左：日齢ごとの体重。右：P9 マウスの側面像と摘出脳の画像。グラフは平均値±SD。1群あたり少なくとも3匹ずつのマウスを測定した。**P<0.01。

Nestin-Cre による Tfam のノックアウトが不完全に行われている、すなわち flox の切断不良の可能性を考慮し、Stra8-iCre マウスを用いて全身性に Tfam をノックアウトしたマウスの系統を作製した。Tfam^{fl/1};Nestin-Cre⁺マウスは flox アレルが1本であるため、より効率的に Tfam が切断されると考えられた。しかし、Tfam^{fl/1};Nestin-Cre⁺マウスは Tfam^{fl/fl};Nestin-Cre⁺マウスと同様の表現型を示したことから、flox アレルはその数に拘わらず、Cre 組換え酵素

によって効率的に切断されていると考えられた。したがって、**Tfam cKO** の表現型が予想より遅れて現れるのは、**Cre** 組換え酵素の効率が低いからというわけではないと考えられた。

次に、マウス大脳皮質の冠状断切片を作製し、**HE** 染色による組織学的解析を行った。**P0** では、大脳皮質の厚さに **Tfam cKO** とコントロールの間で差異は認めなかった。代表として海馬前端部レベルの冠状断切片の **HE** 染色を示した。しかし、**P9** 脳の **HE** 染色を比較すると **Tfam cKO** マウスの脳は脳室が拡大し、コントロール脳に比べ大脳皮質の菲薄化が明らかであった (図 2)

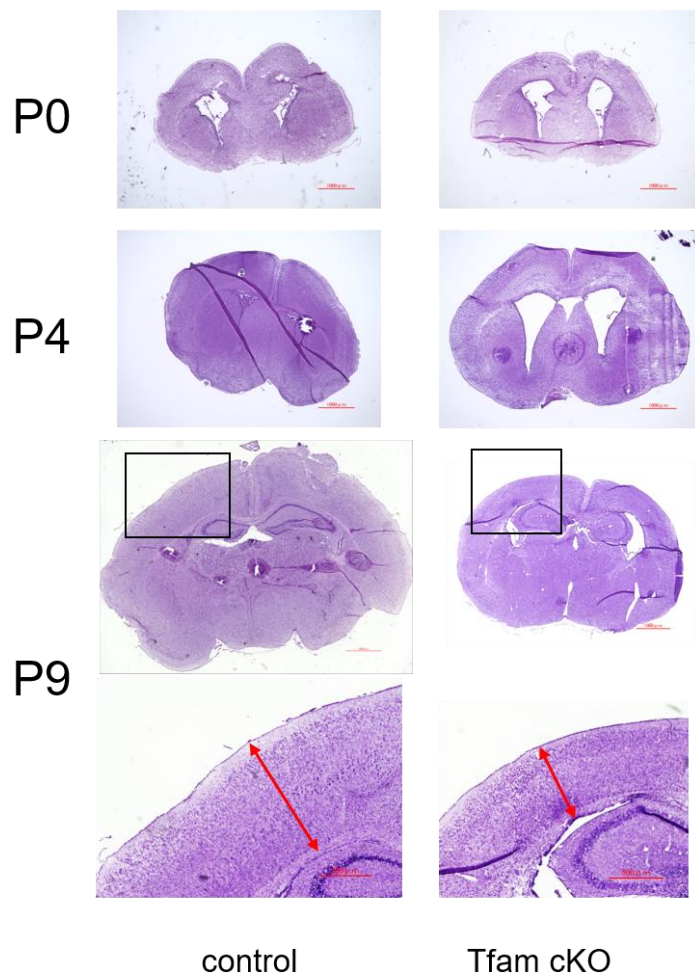


図2 P0、P4、P9の脳冠状断面の切片をH&E染色した代表画像。1~3段目は2倍、4段目はP9の拡大図。矢印はP9大脳皮質の厚さを示す。スケールバー：1000 μ m

P4脳においても、Tfam cKOで脳室の拡大傾向と大脳皮質の菲薄化の傾向が認められた。

脳内の神経細胞を可視化して評価するために蛍光免疫染色を行った。成熟神経細胞の細胞体や樹状突起を特に強く染色する抗MAP2抗体を用い、Tfam cKOとコントロールの脳を比較した。P0脳では、いずれも神経線維形成が未

熟であり、Tfam cKO とコントロールとの間に違いは認められなかった (図 3, 上段)。一方 P9 脳では、コントロールにおいて神経細胞の成熟が進行しており、大脳皮質の表層から深部方向に線維状に伸びる神経線維が観察されるのに対し、Tfam cKO では、抗 MAP2 抗体で染色される神経細胞は認められるものの、線維状の構造形成が乏しかった。(図 3, 中段)。哺乳類の大脳皮質は 6 層からなっており、表面の第 I 層と第 VI 層が形成された後に、脳室帯や脳室下帯に位置する神経幹細胞/前駆細胞から分化して供給された神経細胞が表層へ向けて移動し、第 V→IV→III→II 層と脳室側から順に追い越すように遊走して 6 層構造を形成する^{25, 26}。P9 における Tfam cKO マウス脳の大脳皮質の層構造を、層特異的なマーカータンパク質に対する免疫組織染色法を用いて解析した。抗 Cux1 抗体は大脳皮質第 II/III 層を²⁷、抗 Ctip2 抗体は大脳皮質第 V 層の神経細胞を染色する^{28, 29}。Tfam cKO マウス脳では抗 Cux 1 抗体で染色される第 II/III 層の神経細胞がコントロールと比較して少ない傾向にあったが、層構造自体は適切に保たれていた。すなわち、Tfam の欠損は大脳皮質の形成に必要な神経細胞の遊走能に影響しないことを示していた。第 V 層よりも第 II/III 層の方が Tfam cKO で細胞数が少ない傾向にあるのは、第 II/III 層を形成する神経細胞が遅れて発生し、第 V 層を追い越すように遊走して大脳皮質を

形成することから、発生段階がより後期の細胞の方が **Tfam** 欠損による影響が出やすいためであると推測された (図 3, 下段)。

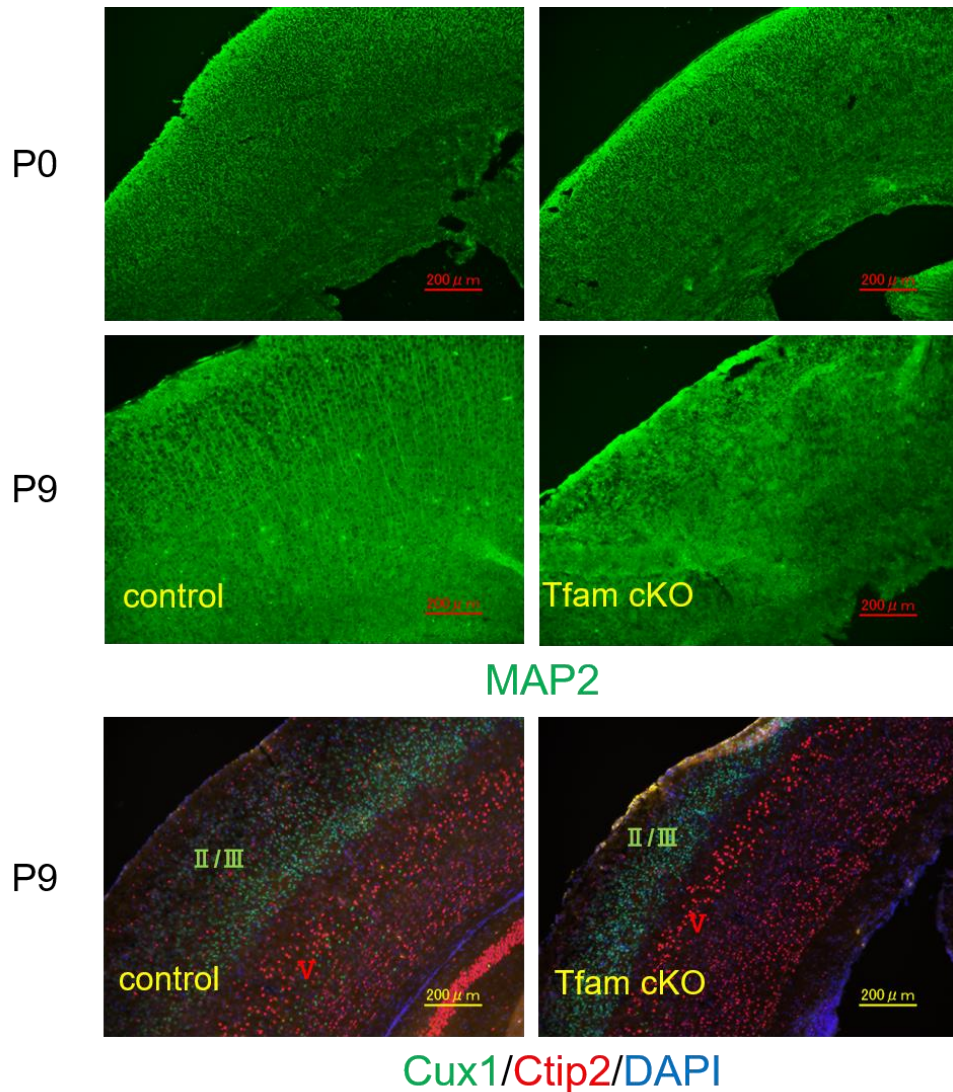


図 3 P0 と P9 の大脳皮質の神経細胞を染色すべく抗 MAP2 抗体で免疫染色した画像。P9 マウス大脳皮質の層構造について免疫染色を行った。Cux1(第 II/III 層) と Ctip2 (第 V 層)。DAPI で核染色。スケールバー : 200 μm

脳室帯に存在する神経幹細胞と脳室下帯に存在する神経前駆細胞を、それぞれ抗 Pax6 抗体と抗 Tbr2 抗体で染色した。P0 脳では神経幹細胞および神経前駆細胞ともに Tfam cKO とコントロールで数に大きな差異はなかった。P6 脳では、神経幹細胞の数に大きな違いはなかったが、神経前駆細胞の数が Tfam cKO で減少している傾向があった。P0 脳と P6 脳の解析結果から、神経前駆細胞から神経細胞への分化のみならず、神経幹細胞から神経前駆細胞の形成過程にも正常なミトコンドリア機能が必要であると考えられるが、この点に関してはさらなる検証が必要である (図 4)。

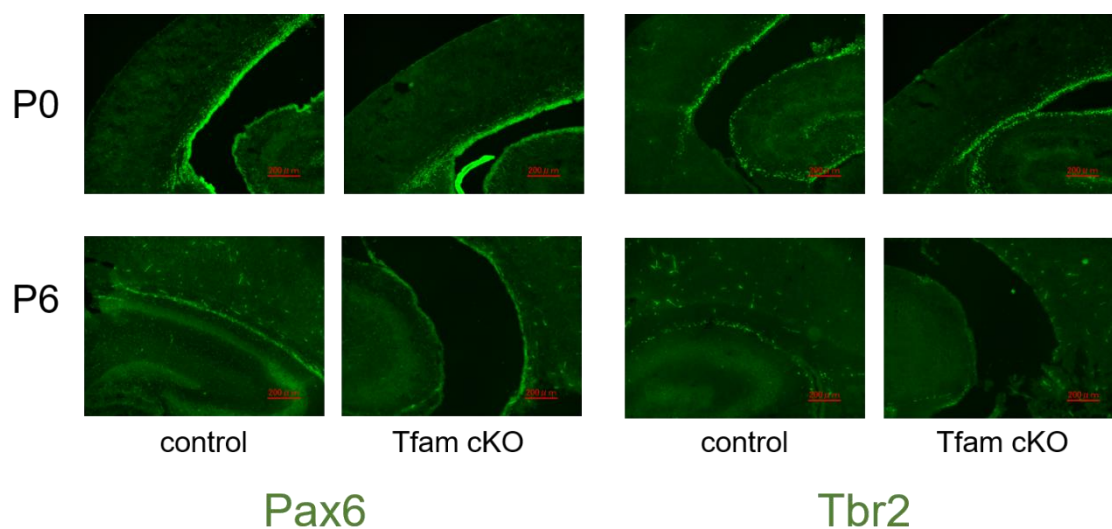


図 4 P0 と P6 の大脳皮質の神経幹細胞・神経前駆細胞を染色すべく抗 Pax6 抗体と Tbr2 で免疫染色した画像。脳室帯の神経幹細胞と脳室下帯の神経前駆細胞が染色される。スケールバー：200 μ m

TFAM が欠損している脳では神経発生の過程において神経細胞の成熟や神経ネットワークの形成にも影響があるのではないかと考え、P10 の Tfam cKO マウス脳をゴルジ染色し、軸索の伸長と樹状突起の形成を調べた。Tfam cKO 脳では、コントロール脳に比べて軸索の長さが短い傾向にあり、樹状突起の数が明らかに少なく、スパインの形成も不良だった。以上の結果から、神経細胞の成熟や神経ネットワークの形成にも正常なミトコンドリア機能が必須であることが示唆された (図 5)。

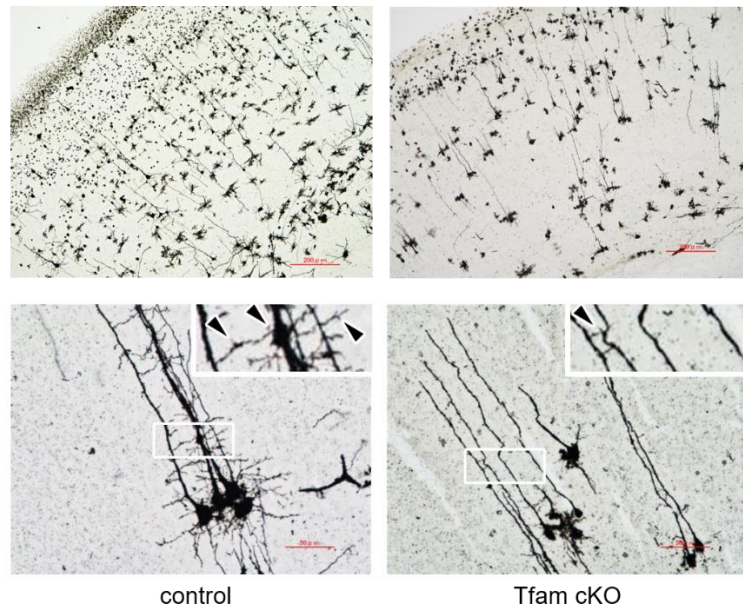


図5 P10 マウス大脳皮質のGolgi染色画像。上段は4倍 下段は10倍 右上に拡大図を示す。Tfam cKO では樹状突起やspine (矢頭)が少ない。スケールバー：上段 200 μm 下段 50 μm

TFAM は mtDNA の維持に必須であるので、Tfam cKO 脳における大脳皮質の mtDNA のコピー数をコントロール脳と比較し、コントロールに対する相対量として示した。Tfam cKO のコントロールに対する mtDNA の相対量は、E14.5 から P0 にかけて減少した (図 6)。

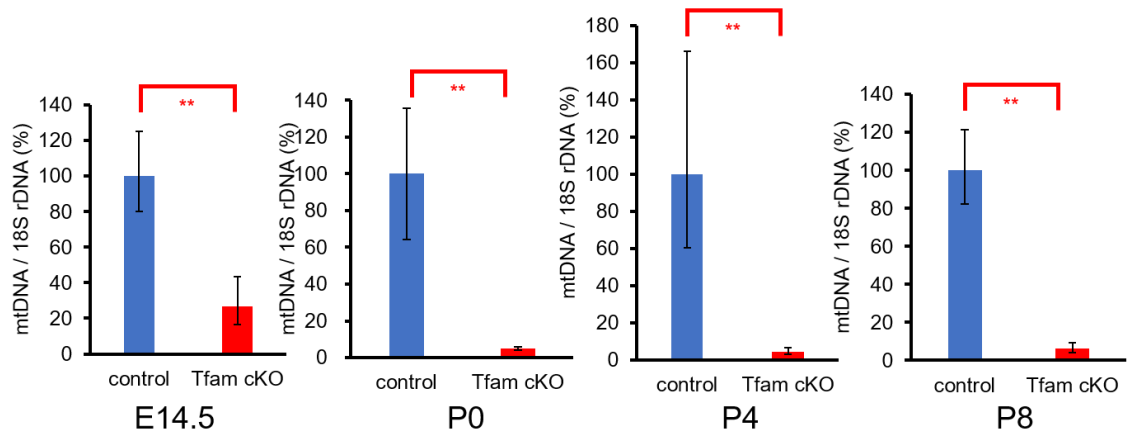


図6 E14.5、P0、P4、P8 マウス大脳のリトコンドリア DNA(mtDNA) コピー数の定量的 PCR 分析結果。グラフは平均値±SD を示す。**P < 0.01. 少なくとも 2 回以上の独立した実験を行った。

Tfam cKO マウスの大脳皮質における mtDNA のコントロールに対する相対量は、P0 時点で既にコントロールの 10 分の 1 以下であり、P8 時でも同様であった。P0 の Tfam cKO マウスでは、見かけの表現型は認められず、組織学的にもコントロールと比べて差が認められなかったにも関わらず、mtDNA 量に関してはコントロールと比較して大きな差があることは驚くべきことであった。

2) Tfam cKO マウス由来の神経幹細胞／前駆細胞は、増殖能および神経分化能が低下し、mtDNA の遺伝子発現が低下している

さらに、神経発生における TFAM の役割を明らかにするために、神経幹細胞や神経前駆細胞から形成されるニューロスフェアを用いて、*in vitro* での解析を行った。E14.5 マウスの前脳を摘出し、神経幹細胞／前駆細胞を含む細胞懸濁液を調製し、これらの細胞を神経幹細胞増殖培地で 4~6 日間培養してニューロスフェアを形成させ、増殖した細胞を用いてさらなる解析を行った。まず、増殖能を調べるために細胞を播種して 10 日間培養し、ニューロスフェアの数と大きさを測定した。Tfam cKO 細胞は、コントロール細胞よりも大きなスフェアを形成する能力が明らかに低下していた(図 7)。

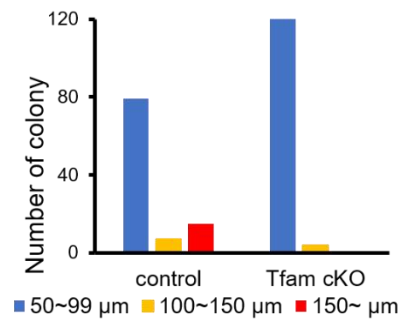
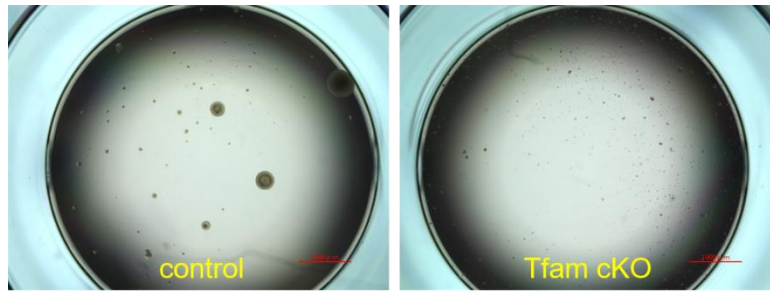


図7 上断：ニューロスフェア形成能の測定。96 ウェルプレートで形成されたニューロスフェアの画像。下段：形成されたニューロスフェアの数を大きさごとに測定したグラフ。遺伝子型ごとに少なくとも3つの独立した細胞クローンを測定した。スケールバー：1000 μm

神経幹細胞の増殖能を評価するために、細胞に BrdU を取り込ませ、取り込まれた BrdU を抗 BrdU 抗体を用いて染色し、BrdU 陽性細胞の数を調べた。コントロールの神経幹細胞では約 40%の細胞が BrdU 陽性だったが、Tfam cKO の神経幹細胞では 10%程度だった (図 8)。

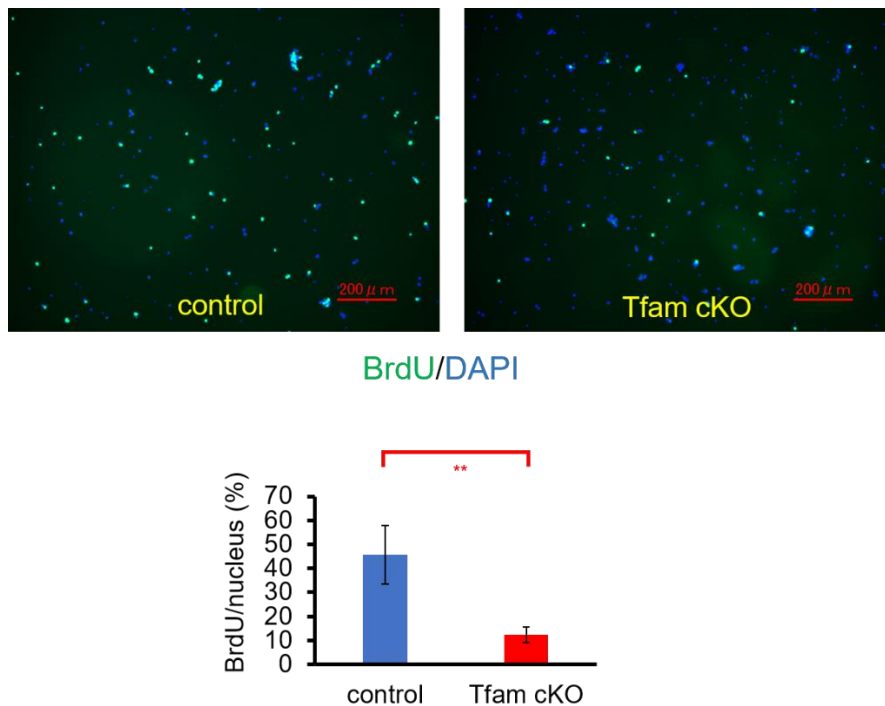
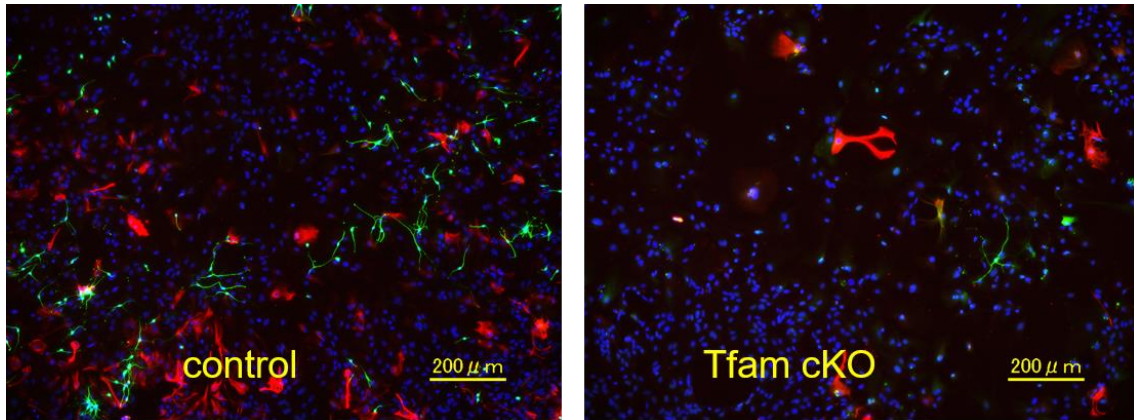


図8 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) 取り込み能の測定。10 μ M BrdU を添加した神経増殖培地中で NSC を 2 時間培養し、細胞へ取り込まれた BrdU を抗 BrdU 抗体で検出し、核を DAPI で染色し細胞数あたりの BrdU 陽性細胞の割合を測定した。グラフは平均値 \pm SD を示す。** $P < 0.01$. 遺伝子型ごとに少なくとも 2 クローンずつ測定した。スケールバー : 200 μ m

Tfam cKO の神経幹細胞はコントロールに比べて増殖能が著しく低下していることが明らかとなった。

次に、ビタミン A や血清を含む神経分化培地で神経幹細胞／前駆細胞を 7 日間培養することで分化誘導し、Tfam cKO 神経幹細胞／前駆細胞の分化能を調べた。分化誘導後、神経細胞は抗 Tuj1 抗体で、アストログリアを主とするグリア細胞は抗 GFAP 抗体で染色した (図 9)。



Tuj1/GFAP/DAPI

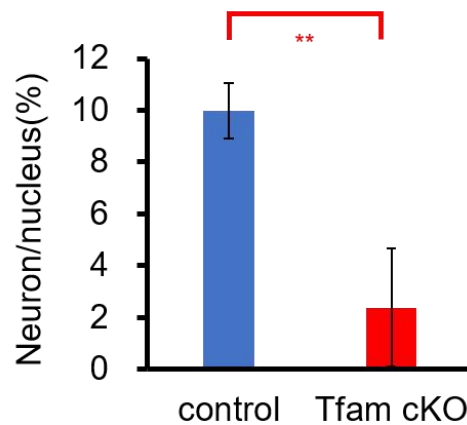


図9 NSCの分化能の測定。カバーガラス上へ撒布したNSCを神経分化培地で7日間培養した。抗Tuj1抗体および抗GFAP抗体による免疫染色で神経細胞とアストログリアを、DAPIで核を検出した。グラフは平均値±SDを示す。**P<0.01. 遺伝子型ごとに少なくとも3つの独立したクローンを測定した。スケールバー：200 μm

Tfam cKOではコントロールと比べTuj1陽性細胞が著しく少なかった。この結果は、Tfamの機能が低下すると神経幹細胞の神経分化に影響することを示しており、上述の*in vivo*の結果を反映していた。Tfam cKOではアストログリアの数も減少しているように見えるが、形態的にアストログリア細胞に類

似し、抗 GFAP 抗体で弱く染色される細胞が Tfam cKO では多く認められることから、Tfam cKO 細胞ではアストログリア細胞の GFAP 発現が何らかの理由で遅れたり、弱まったりしているのではないかと考えられた。本研究では神経分化におけるミトコンドリア機能の解析を優先したので、アストログリア細胞のミトコンドリア機能に関しては、今後のさらなる検証が必要である。

mtDNA の相対量を胎齢 14.5 日 (E14.5) のマウス大脳皮質細胞および E14.5 マウス脳から分離し、さらに神経幹細胞増殖培地で 3 日間培養した細胞 (E14.5+3) で行った。E14.5 の Tfam cKO 細胞ではコントロールと比較した mtDNA の相対量は 20%程度だったが、E14.5+3 では、それが 10%以下に低下していた(図 10)。

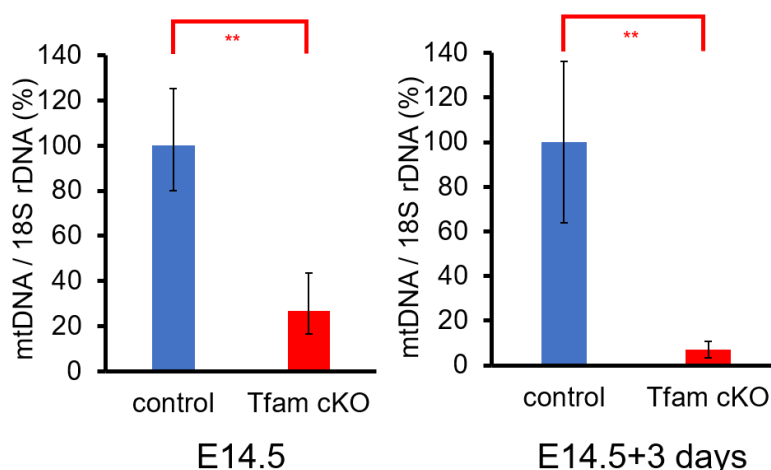


図 10 mtDNA コピー数の測定。18S rRNA 遺伝子量を標準として mtDNA 量を qRT-PCR で測定した。グラフはコントロールを 100%として示す。左図は E14.5 の大脳皮質の

細胞から、右図は3日間培養して形成されたニューロスフェアから抽出した mtDNA 量を測定した。グラフは平均値±SDを示す。**P < 0.01.

これらの結果から、Tfam 欠損による mtDNA の減少は細胞増殖と共に進行し、E14.5+3 での Tfam cKO における mtDNA の相対量は P0 脳とほぼ同等であることが示された (図 6、図 10)。

神経幹細胞増殖培地で4日間培養した神経幹細胞/前駆細胞における mtDNA および nDNA にコードされる遺伝子の発現を調べた。まず神経幹細胞/前駆細胞における Tfam の発現を調べた。Cre 組換え酵素の作用により欠失するエクソン上にプライマーを設計したので、このプライマー対を用いると野生型アリルから産生された Tfam 転写物のみを検出することができる。Tfam cKO 細胞では、Tfam mRNA の発現はほとんど検出されなかった。同様に電子伝達系に関する遺伝子と Pgc1 α を測定したところ Tfam cKO 細胞では mtDNA にコードされる遺伝子の発現がコントロール細胞と比べて低下しており、一部には有意差が認められた。nDNA にコードされた遺伝子の発現は、Tfam cKO 細胞でコントロール細胞と比較して増加する傾向があったが、これは代償によるものであると考えられた (図 11)。

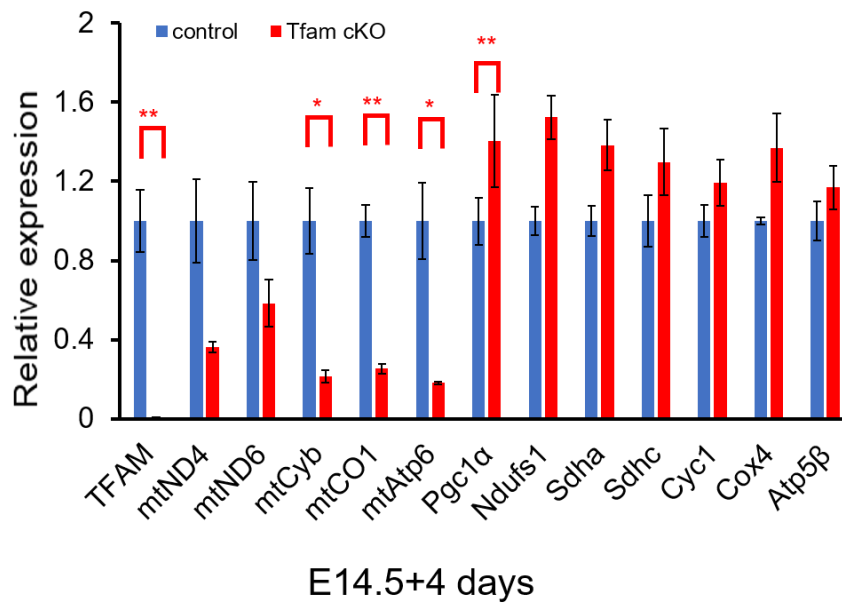


図 11 mtDNA と核 DNA(nDNA)にコードされる酸化的リン酸化(OXPHOS)関連遺伝子の発現量の測定。各遺伝子の発現量は、 β アクトチンの発現量で補正し、コントロールの数値を 100%として表示。グラフは平均値 \pm SD を示す。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

3) Tfam cKO 細胞ではミトコンドリア機能が変化している

細胞内で Tfam が減少することで代謝がどのように影響されるかを調べるために、電子伝達系の各複合体の阻害剤に対する反応を、細胞外フラックスアナライザーを用いてミトストレステストを行うことで解析した (図 12)。

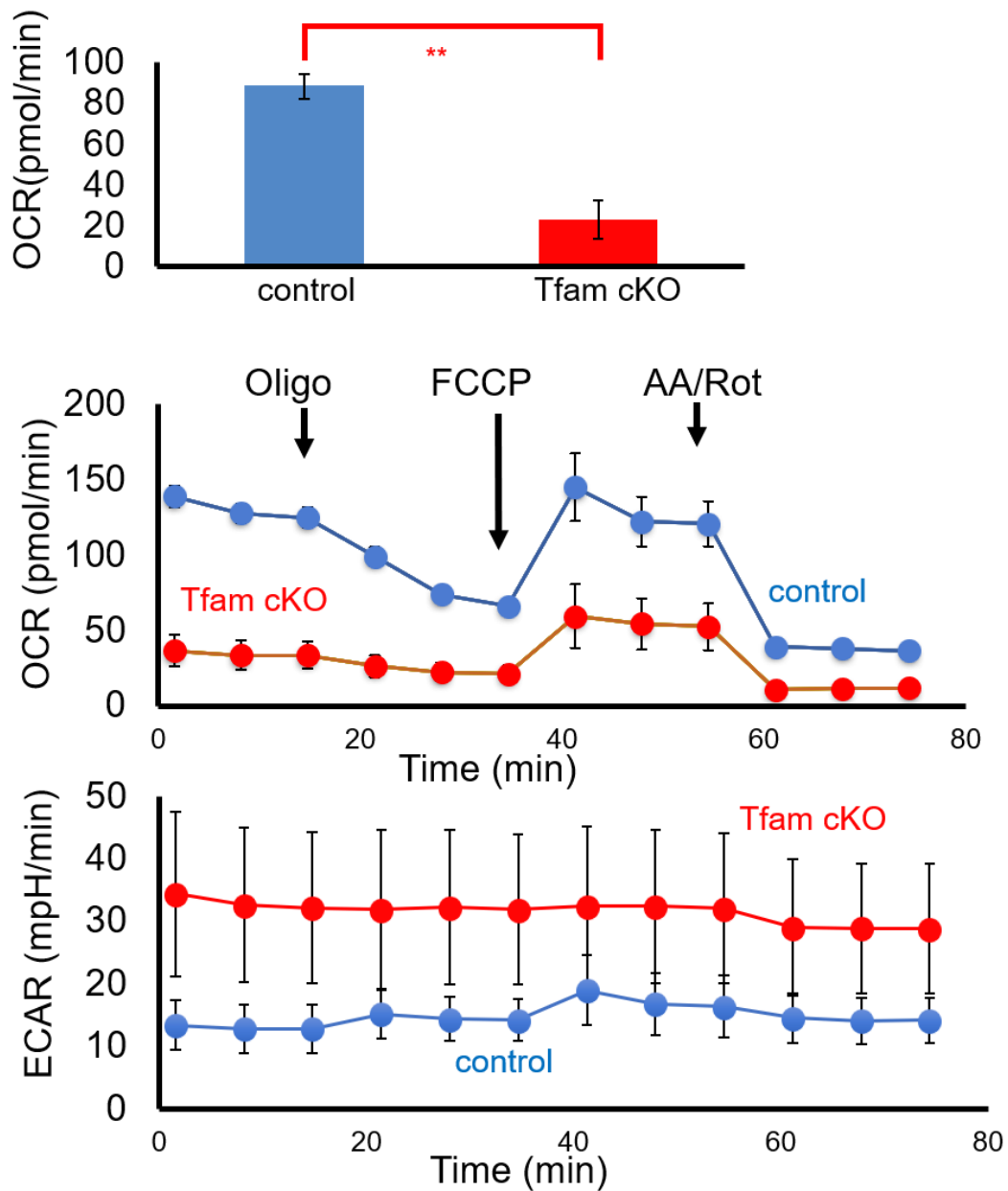


図 12 コントロールと Tfam cKO NSCs の酸素消費率(OCR)と細胞外酸性化率(ECAR)をフラックスアナライザーを用いて測定した。上段：基礎呼吸、中段：ミトストレステスト中の OCR、ミトストレステスト中の ECAR。グラフは平均値±SD を示す。**P < 0.01. 遺伝子型ごとに少なくとも 3 つの独立したクローンを測定した。

Oligo : oligomycin : complex V 阻害薬

FCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone : 脱共役剤

AA/Rot : antimycin A/ Rotenone : complex III/ complex I 阻害剤

神経幹細胞増殖培地で4日間培養した神経幹細胞／前駆細胞を用い、解析培地で1日培養した後に活性を測定した。予想したように **Tfam cKO** 細胞はミトストレステストの過程を通して、コントロールと比較して酸素消費速度（OCR）が有意に低かった。**Tfam cKO** 細胞の基礎呼吸はコントロール細胞と比較して3分の1以下だった。**Tfam cKO** 細胞の細胞外酸性化速度（ECAR）がコントロール細胞に比べて高かったことから、**Tfam cKO** 細胞では乳酸産生が亢進していることが示唆された。以上の結果は、**Tfam cKO** 細胞では酸化的リン酸化（OXPHOS）が抑制されており、その代償として解糖系が亢進していることを示している。

適量の活性酸素種がシグナル因子として働き神経分化に関与している可能性が示唆されていることから、細胞の活性酸素種を測定した。細胞全体の活性酸素を検出する DCFH-DA（2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate）を使用しフローサイトメトリー（FCM）で活性酸素種を測定したところ、**Tfam cKO** 細胞とコントロール細胞で大きな違いが見られなかった。次に、ミトコンドリア由来のスーパーオキシド（ $O_2^{\cdot-}$ ）に特異的に反応する MitoSOX で細胞を染色し、FCM を用いて活性酸素を測定した（図 13）。

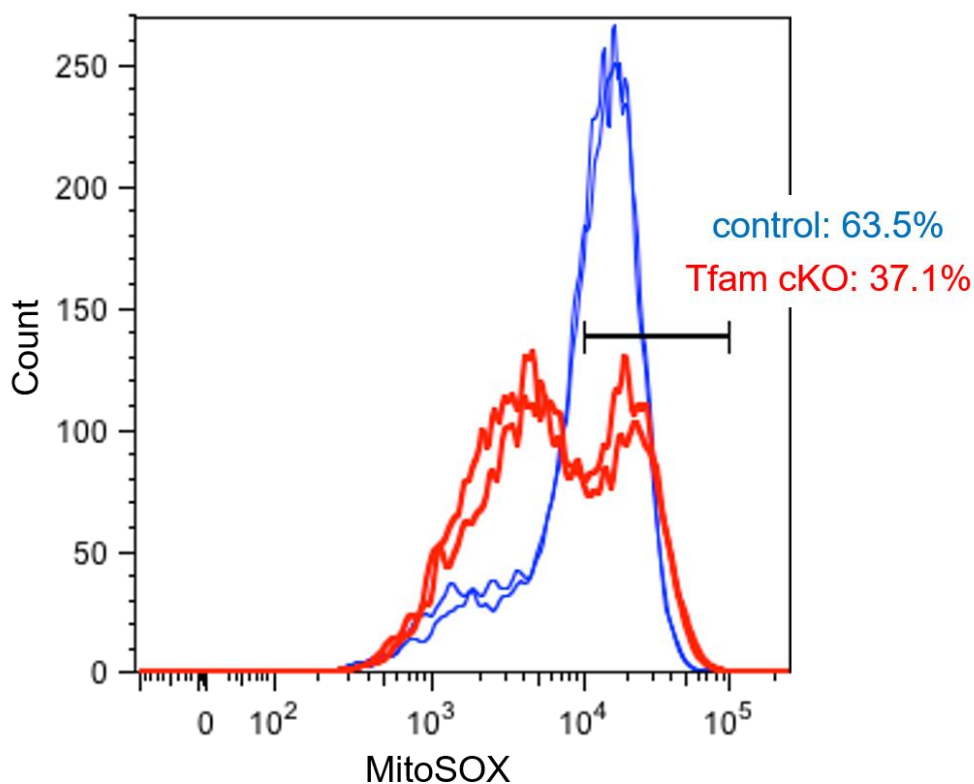


図 13 ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)を、MitoSOX Red 色素を用いてフローサイトメーター(FCM)で測定した。コントロールと Tfam cKO の NSC をそれぞれ 2 クローンずつ測定した結果を示す。同様の試験を独立して 2 回行った

Tfam の欠損によりミトコンドリア活性が低下すると、ミトコンドリアからの ($O_2^{\cdot-}$) の産生が有意に低下した。このことは、Tfam cKO 細胞では、ミトコンドリアにおける酸素消費率が極端に低下し、それにともないミトコンドリアからの活性酸素種の産生が減少していることを示唆している。活性酸素種の減少が Tfam cKO 細胞の神経分化の障害に関係しているかどうかを調べるために、スーパーオキシドのスキャベンジャーである EUK134^{30, 31} をコントロール細胞

に処理し、神経分化に及ぼす影響を検討した。EUK134 処理により神経細胞への分化は有意に低下したが、グリア細胞への分化には影響がなかった (図 14)。

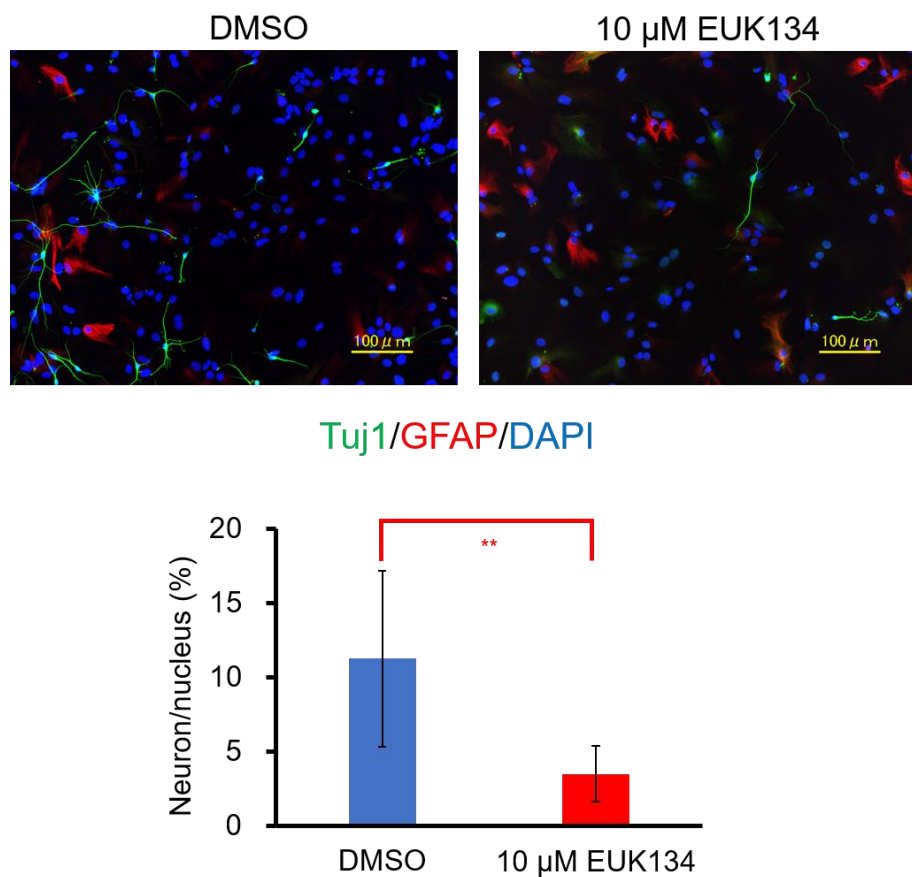
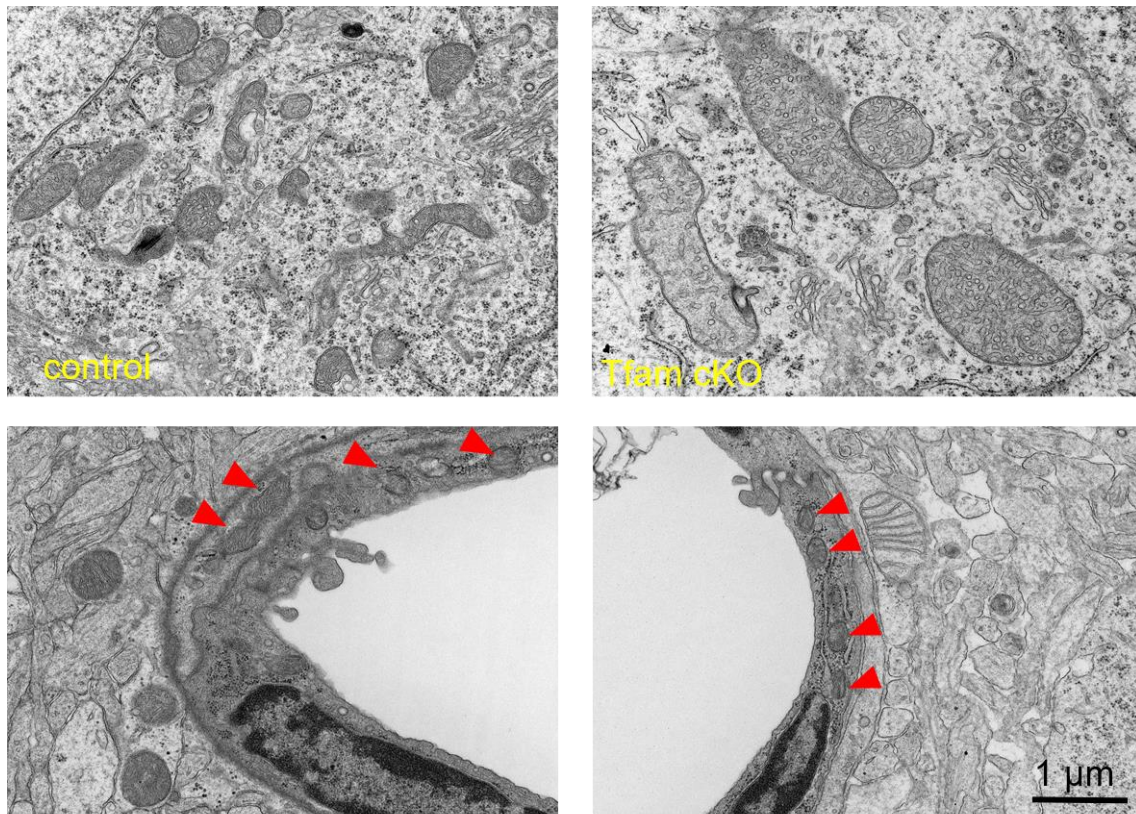


図 14 抗酸化剤である EUK134 による神経分化能への影響。神経分化培地に EUK134 を添加して NSC を培養した群と DMSO のみ添加の群の神経分化能を測定した。神経細胞とアストログリアを抗 Tuj1 抗体と抗 GFAP 抗体で免疫染色して、核を DAPI で染色し、神経細胞の割合を測定した。グラフはコントロールを 100%として提示し、平均値±SD。
**P < 0.01。2 つの独立した実験を行った。スケールバー : 100 μm

以上の結果は、神経分化が効率的に進行するには適量の活性酸素種が必要であり、活性酸素種産生の減少が **Tfam cKO** 神経幹細胞／前駆細胞における神経分化能低下の原因の一つである可能性を示唆している。

4) Tfam cKO 脳では神経細胞のミトコンドリアの形態学的異常と電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体成分の発現低下がみられる

Tfam cKO 脳のミトコンドリアの形態を評価するために、P10 の大脳皮質の錐体細胞を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、**Tfam cKO** の錐体細胞のミトコンドリアは、コントロールの錐体細胞に比べて膨化し、内部のクリステが粗造化していることが明らかになった。一方、**Tfam cKO** の血管内皮細胞のミトコンドリアはコントロールと同様の形態であった。ネスチンプロモーターによって主に神経幹細胞／前駆細胞に **Cre** 組換え酵素が発現することから、**Tfam cKO** 脳では神経幹細胞／前駆細胞由来の細胞のミトコンドリアが強く影響を受けることを示している(図 15)。



P10

図 15 透過型電子顕微鏡 (TEM) によるミトコンドリアの超微細構造解析。P10 マウス脳切片から第V層錐体細胞を TEM で観察した像。上段：Tfam cKO 脳では、第V層の錐体細胞のミトコンドリアが膨潤して拡大している。下段：血管内皮細胞のミトコンドリア (矢頭)は正常に見える。遺伝子型ごとに少なくとも2つの独立した脳を調べた。スケールバー：1 μm

さらに、P9 脳組織切片において、ミトコンドリアに集積される PHB2 と MTCO1 に対する抗体を用いた免疫染色を行った。PHB2 は nDNA コード、MTCO1 は mtDNA コードであり、予想通り、Tfam cKO 脳では神経細胞の

MTCO1 で染色されるミトコンドリアの数が減少しており、mtDNA にコードされる遺伝子の発現低下が確認できた(図 16)。

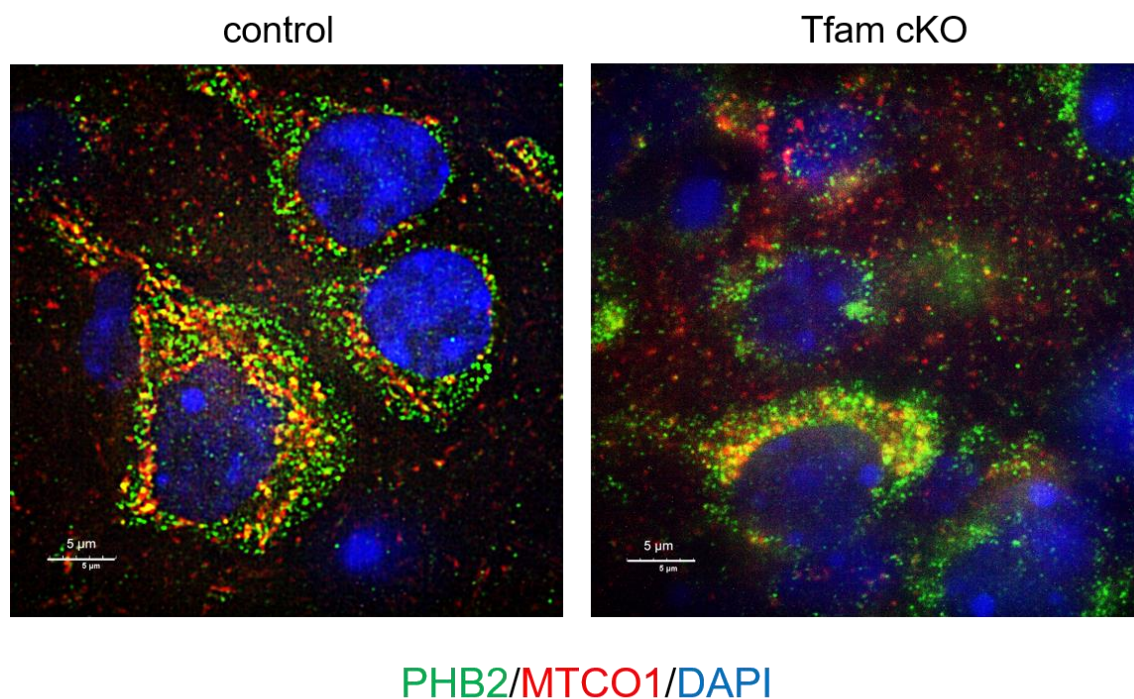
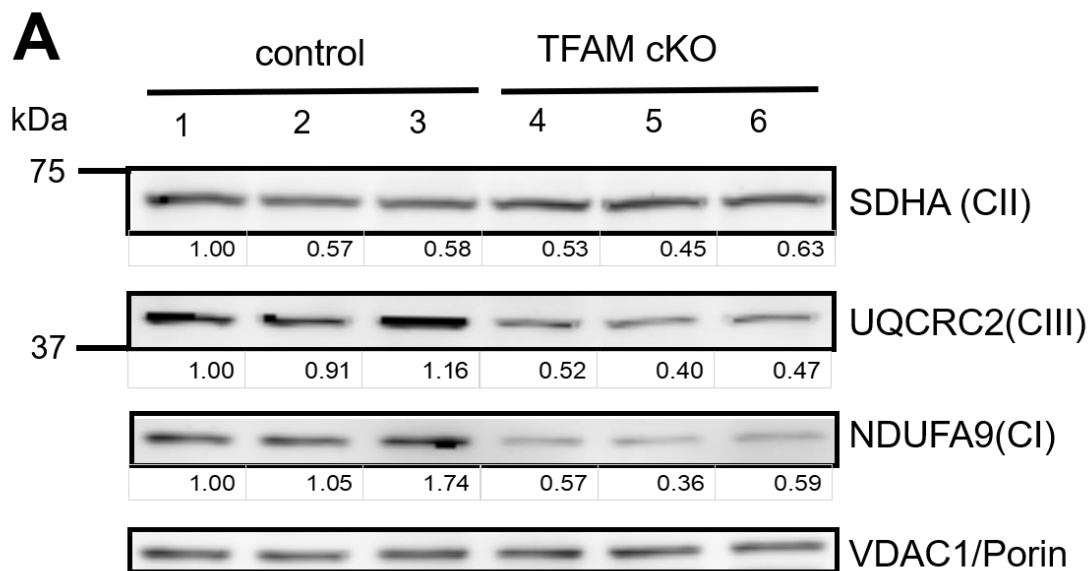


図 16 P9 マウス脳第 V 層錐体細胞のミトコンドリアを PHB2、MTCO1 で免疫染色し、核を DAPI で染色した。スケールバー：5 μm

次に、P0 及び P8 の Tfam cKO 脳における 電子伝達系を構成するタンパク質の発現レベルをウエスタンブロットで解析した。nDNA にコードされる NDUFA9 (複合体 I) と UQCRC2 (複合体 III) の発現は、Tfam cKO 脳ではコントロール脳と比較して特に P8 で有意に減少していた。ミトコンドリアのローディングコントロールとして用いた VDAC1/Porin の発現は Tfam cKO 脳

とコントロール脳で同様であったことから、ミトコンドリアの数に変化はないと考えられた。複合体 II を構成する SDHA の発現は、Tfam cKO 脳ではコントロール脳と比較して同等またはわずかに高かった。複合体 I と複合体 III は mtDNA と nDNA にコードされるサブユニットから構成されるため、mtDNA にコードされるサブユニットが減少すると複合体が不安定になり、結果として nDNA コードの NDUFA9 と UQCRC2 の減少を招いた可能性がある。このことは、mtDNA にコードされるサブユニットを含まない複合体 II のサブユニットである SDHA の発現が、Tfam cKO で影響を受けなかったことから強く支持される(図 17)。



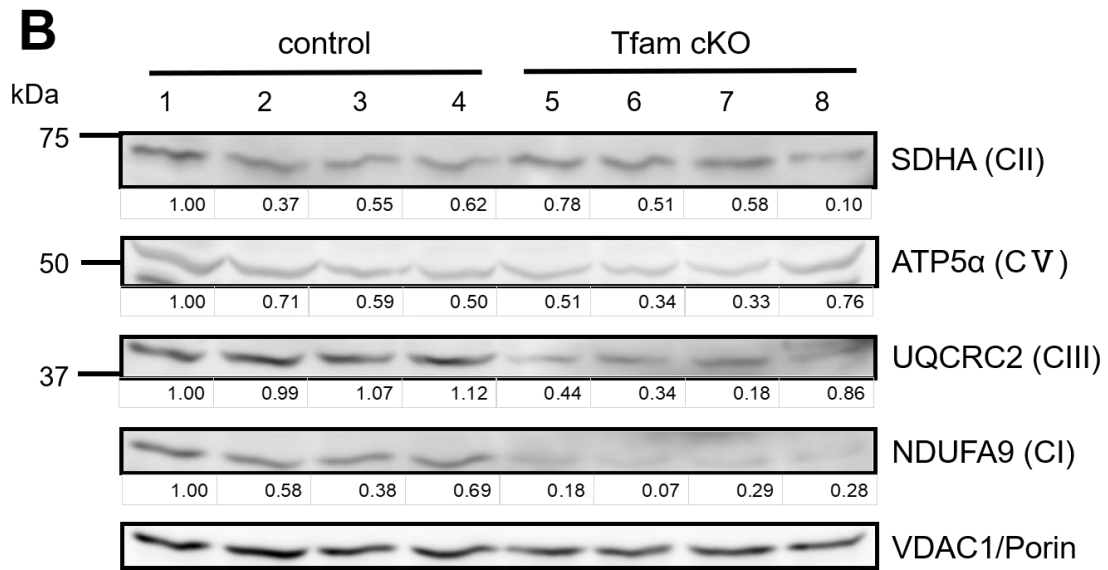


図 17 P0 (A) 及び P8 (B) マウス脳から抽出したタンパク質をウェスタンブロットで解析した。使用した抗体：SDHA(complex II)、ATP5 α (complex V)、UQCRC2(complex III)、NDUFA9(complex I)、VDAC1。数値は VDAC1 で補正して control の一つを 1 とした相対値。

P0, P4, P8 脳から抽出した RNA を用いて、mtDNA にコードされる mRNA の発現を qRT-PCR で検討した。mtDNA にコードされる mRNA のうちいくつかの発現レベルは、P0 の Tfam cKO 脳でもすでにコントロールの 20%以下に低下していた (P0 のみ、図 18)。

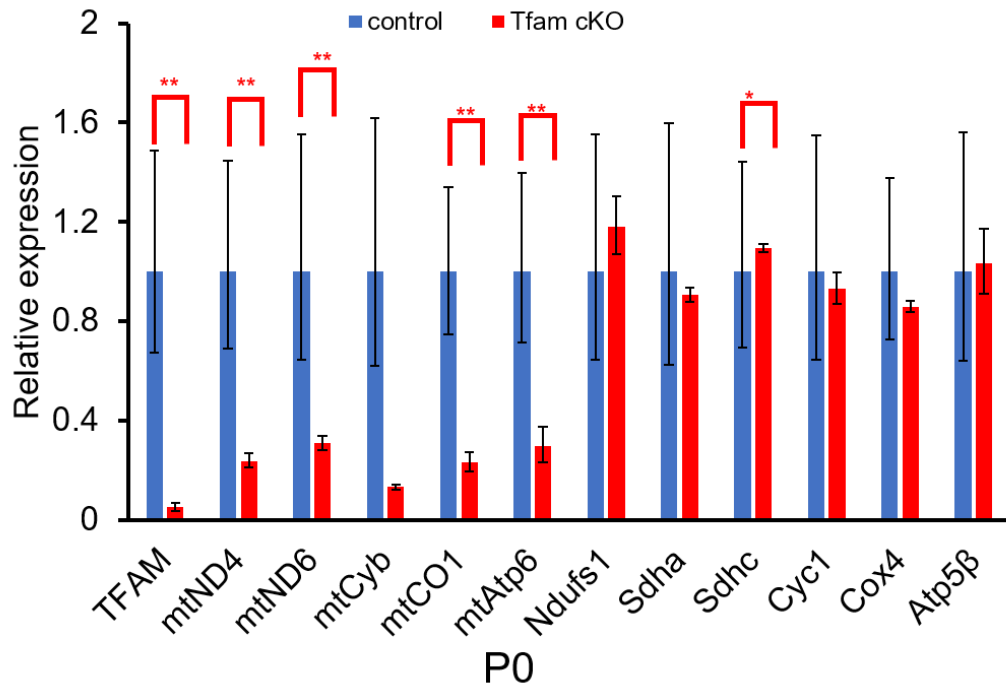


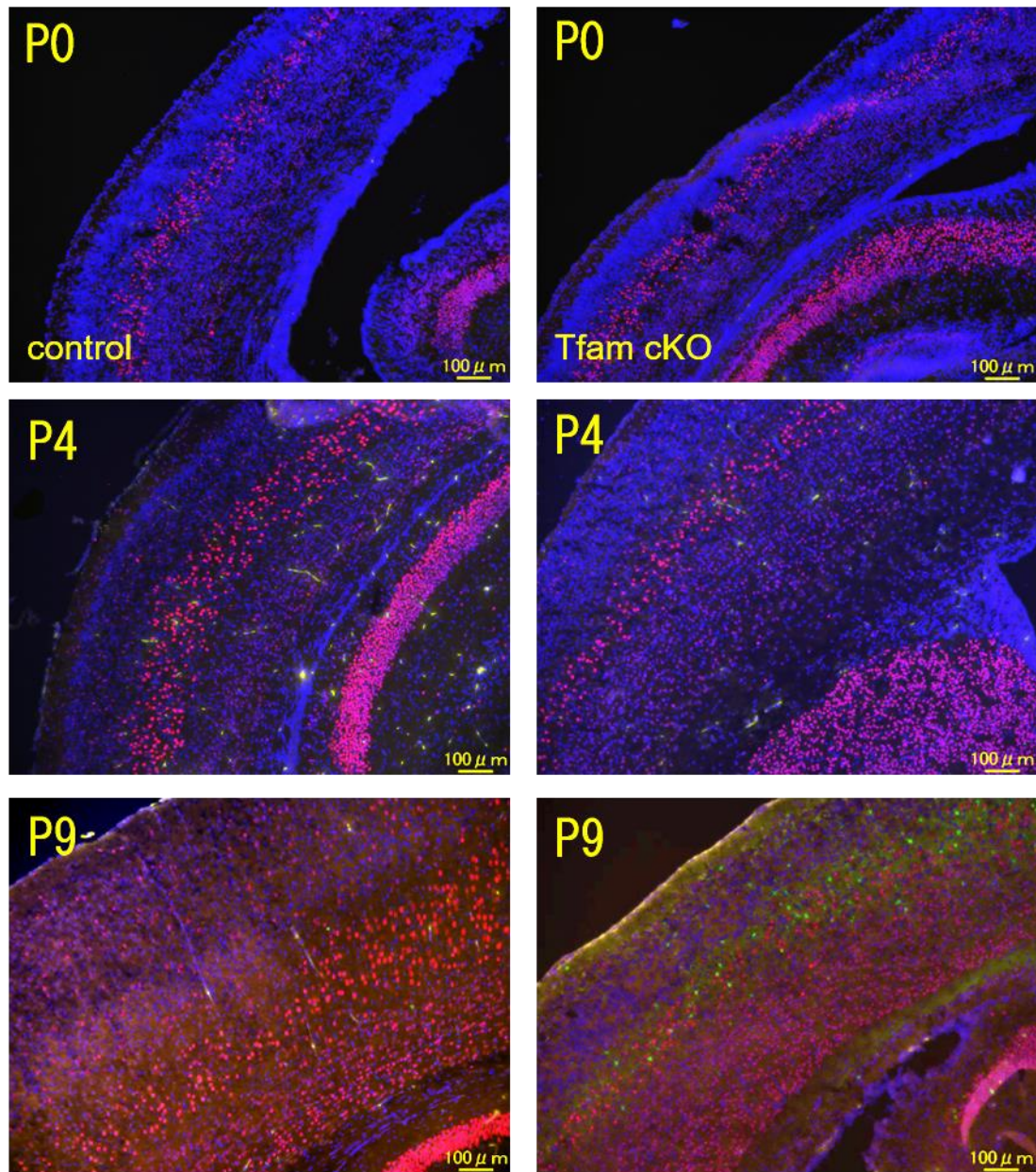
図 18 P0 マウス脳から抽出した RNA から cDNA を作成し、OXPHOS に関する遺伝子発現量を qRT-PCR で解析した。各遺伝子の発現量は β アクチンの発現量で補正し、コントロールの数値を 1.0 として表示。グラフは平均値 \pm SD を示す。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

ミトコンドリア活性は、mtDNA にコードされる mRNA よりもむしろ mtDNA にコードされるタンパク質に依存している可能性が高かった。mtDNA にコードされるタンパク質である MTCOI と MTCOII を市販の抗体を用いてウェスタンブロットでの検出を試みたが、特異的なバンドを検出することはできなかった。以上の結果から、TFAM の欠損により Tfam cKO 脳ではミトコンドリアの機能障害が引き起こされると考えられた。

脂質代謝に関する遺伝子発現を qRT-PCR で測定したところ、個体差が大きく有意な差は認められなかったが、Tfam cKO で脂質代謝が亢進している傾向は認められた。この点については現時点で明確なことは言えないが、Tfam 欠損によってエネルギー源が脂質へシフトしている可能性も今後検討の余地がある。

5) アポトーシスは神経発生の初期には起こらず、Tfam cKO 大脳皮質ではミクログリアの活性化が先行する

出生時には Tfam cKO マウスの大脳皮質の厚さはコントロールと同様であるが、生後時間経過とともに、コントロールと比較して菲薄化する。我々は、Tfam cKO マウスの大脳皮質の菲薄化にはアポトーシスが関与するのではないかという仮説を立てた。この可能性を検証するために、P0、P4、P9 の大脳皮質を、アポトーシスのマーカーである活性化カスパーゼ 3(Cas3)と大脳皮質第 V 層のマーカーである Ctip2 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。P9 の Tfam cKO マウスの大脳皮質では主に Ctip2 で染色される第 V 層の錐体細胞でアポトーシスが起こっていたが、コントロール脳ではアポトーシスは検出できなかった。P0 と P4 では Tfam cKO 脳もコントロール脳も同様にアポトーシス細胞はほとんど検出されなかった (図 19)。



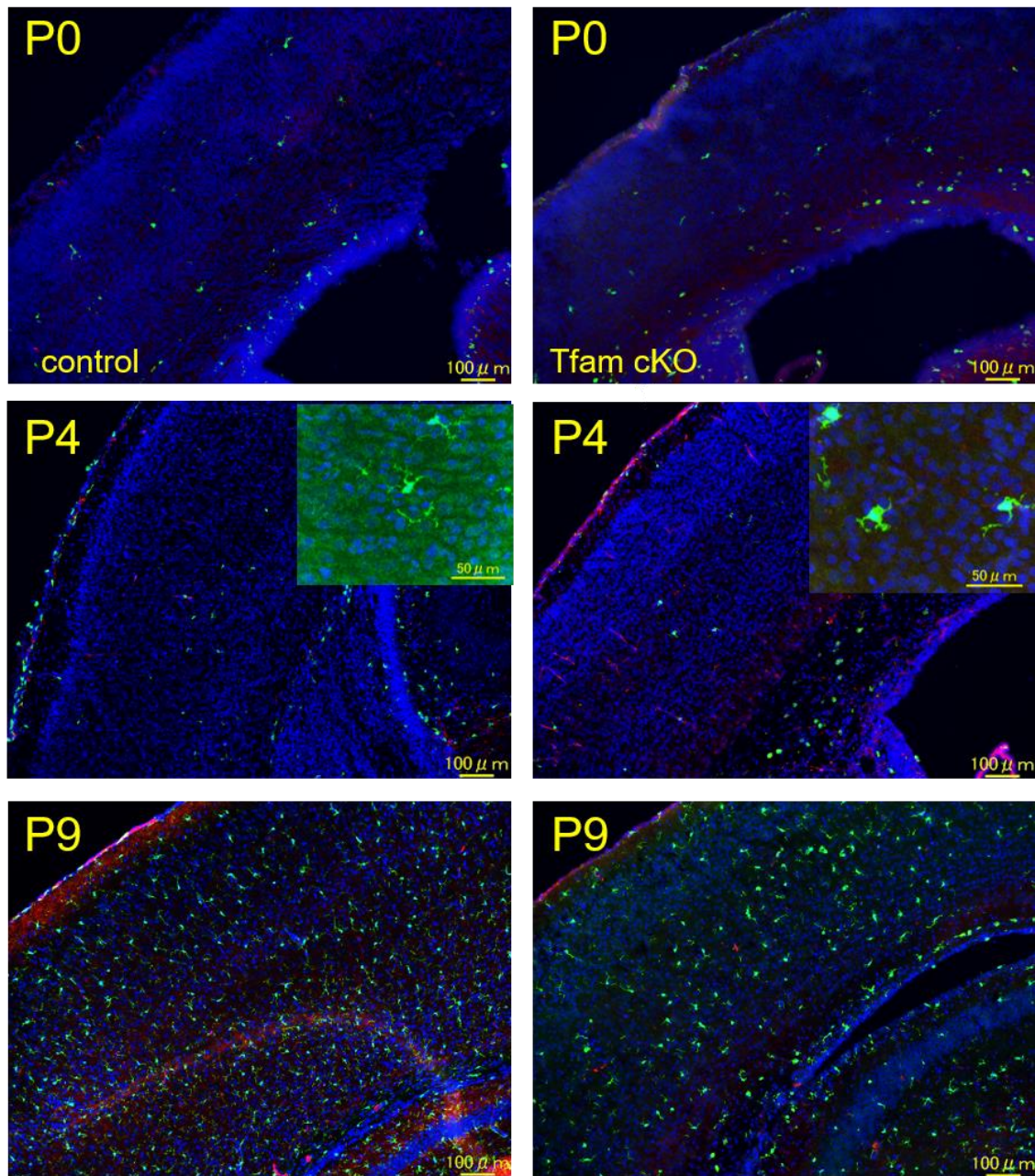
Activated Cas3/Ctip2/DAPI

図 19 P0、P4、P9 大脳皮質に対してアポトーシスを起こしている細胞のマーカである抗活性化カスパーゼ 3(Cas3)抗体および大脳皮質第 V 層を染色する抗 Ctip2 抗体で免疫染色を行った。核は DAPI で染色した。Cas3 で染色されるアポトーシス細胞が P9 の Tfam cKO 脳の第 V 層神経細胞で検出できる。スケールバー：100 μm。

カスパーゼ非依存性のアポトーシスが起こりうることが報告されている³²ので、アポトーシスにともなう DNA の断片化を検出する TUNEL 法で P9 及び P4 マウス大脳皮質を観察したが、抗 Cas3 抗体による染色と同様の結果であったため、カスパーゼ非依存性のアポトーシスが起きているわけではないと考えられた（データ非掲載）。以上より、最終的には Tfam cKO マウス大脳皮質でアポトーシスが起きるが、小頭症はアポトーシスが検出される以前から明らかであるので、アポトーシスは Tfam cKO マウスの脳が小さい主な原因ではないと考えられた。

ミクログリアは中枢神経系のグリア細胞の一種であるが、アストログリアなどとは違い胎生期卵黄嚢由来で、胎齢 10 日前後で中枢神経系へ遊走し、免疫応答など中枢神経系におけるマクロファージ様の挙動を示す。様々な生理的・病的なプロセスに寄与し、脳の恒常性維持に関与していることが知られている。Tfam cKO 脳では P9 になると神経細胞のアポトーシスが起こるため、それを貪食するミクログリアの遊走も増加し、活性化するのではないと考えられた。大脳皮質におけるミクログリアの状態を評価するために、ミクログリアのマーカーである Iba1 に対する抗体を用いた免疫染色によりミクログリアを観察した。P9 では、Tfam cKO 脳の大脳皮質全域で、ミクログリアはラミファ

イド型から活性型であるアメボイド型へ形態変化していた。活性化したマイクログリアは P0 ではコントロール脳でも **Tfam cKO** 脳でもほとんど検出されなかった。P4 では、**Tfam cKO** 脳でのみマイクログリアの活性化が観察され、コントロール脳では観察されなかった。以上より、マイクログリアは神経細胞がアポトーシスを起こした後ではなく、神経細胞のアポトーシスに先行して活性化していることが明らかとなった(図 20)。



Iba1/GFAP/DAPI

図 20 P0、P4、P9 大脳皮質に対して、抗 Iba1 抗体および抗 GFAP 抗体での免疫染色画像。核は DAPI で染色。ミクログリアは高 Iba1 抗体で染色され活性化すると細胞体が膨化する。Tfam cKO 脳では P9 で全般的に活性化しているが、P4 の第 V 層でもすでに活性化している。スケールバー：100 μm 拡大図は 50 μm 。

大脳皮質における炎症やミクログリアの活性化に関連する遺伝子の発現を調べるために、IL-1 β 、IL-6、TNF α 、Ccl2、Ccl5、Isg15 の発現レベルを qRT-PCR で測定した。炎症関連遺伝子である IL-6, TNF α , Ccl2 の発現は、Tfam cKO 脳ではコントロール脳に比べ P8 で増加していたが、P0 と P4 の脳では明らかな増加は認められなかった(図 21)。

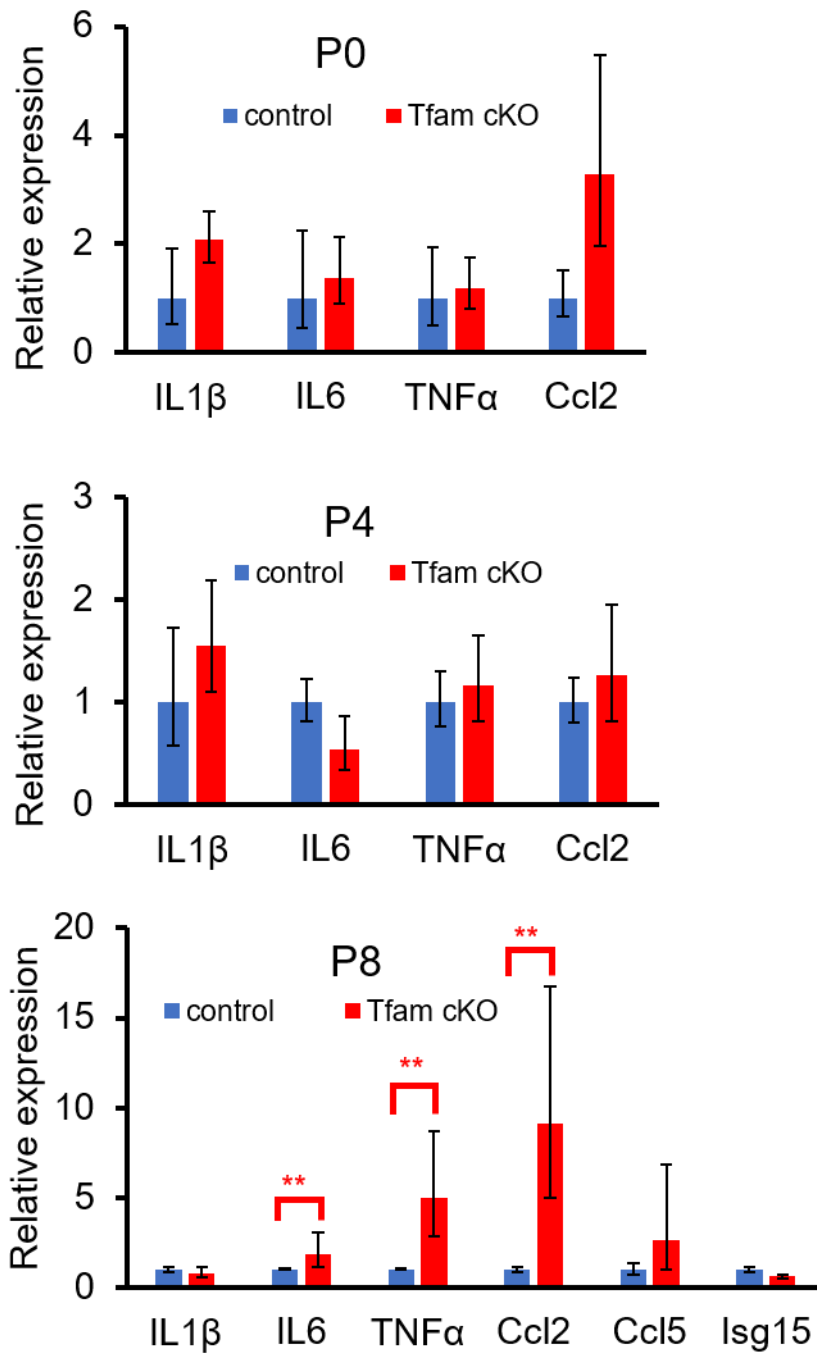


図 21 炎症に関連する遺伝子発現を qRT-PCR で測定した。P8 では Tfam cKO 脳の炎症関連遺伝子がコントロールより有意に上昇している。グラフは平均値 \pm SD を示す。**P < 0.01.

Tfam cKO 脳においても IL-1 β 、Ccl5、および Isg15 といった cGas-stimulator of the interferon genes (STING)経路のターゲット遺伝子³³の発現は特に増加していなかった。以上の結果は、Tfam cKO 脳では cGAS-STING 経路は活性化されておらず、IL-6 や TNF α などの炎症性サイトカインが、主にミクログリアの活性化により発現亢進しているものと考えられた。

6) ミトコンドリアの機能異常により Integrated stress response (ISR) が *in vitro* および *in vivo* で誘導される

真核細胞は、外因性内因性によらず様々なストレスを受けると、細胞内シグナル伝達経路として integrated stress response(ISR)が活性化される。ミトコンドリア機能不全でも同様に、ATF4 の活性化を介した ISR の誘導が *in vitro* で報告されている。Tfam の欠損で ISR が活性化されるかどうかを検討するために、ウエスタンブロット法を用いて、E14.5、P0 および P8 の脳で ISR のキーファクターである ATF4 の発現量を調べた (図 22)。

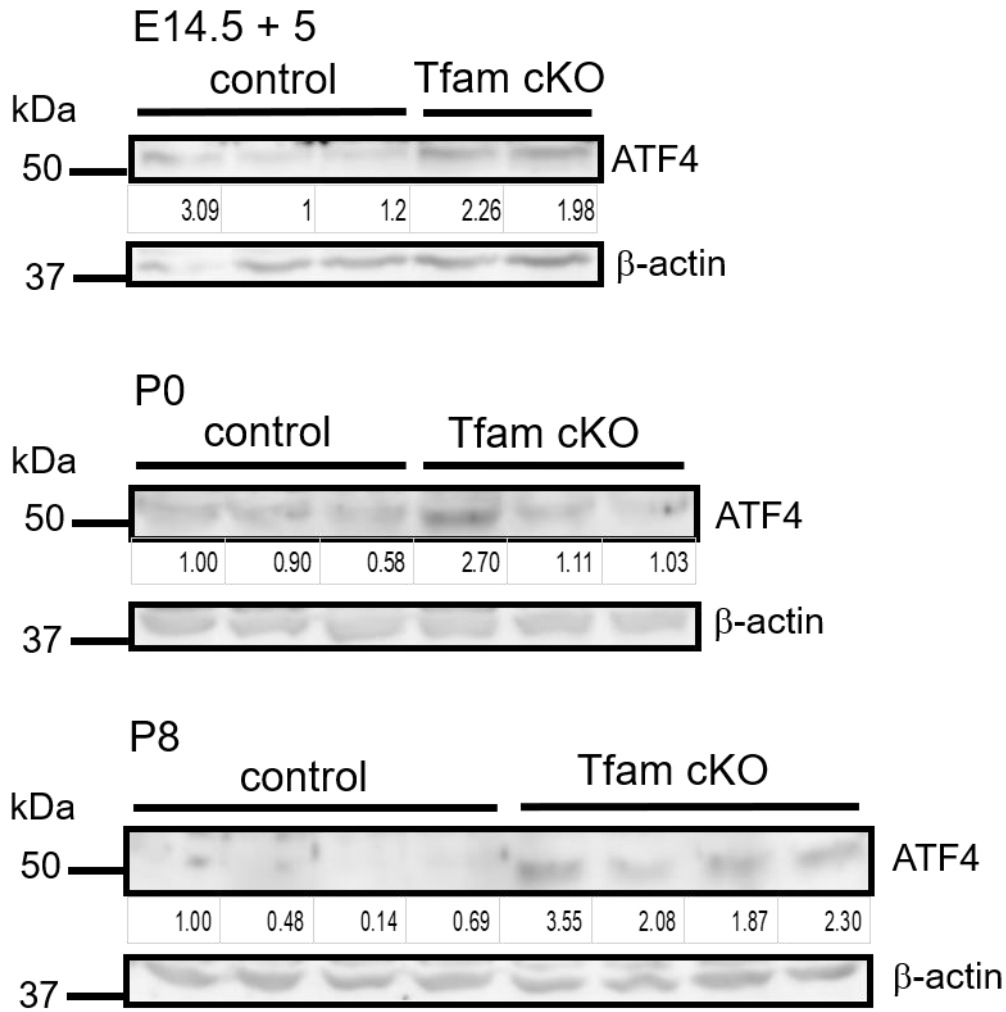


図 22 ニューロスフェア、P0 および P8 脳の ATF4 のウエスタンブロット分析。β-アクチンをローディングコントロールとして用いた。数値はβ-アクチンで補正して control の一つを 1 とした相対値。

P8 では ATF4 が Tfam cKO 脳で増加しており、Tfam cKO 脳由来のニューロスフェアでも増加していた。P0 でも Tfam cKO 脳では ATF4 が増加している傾向だった。ISR が活性化されているかどうかをさらに調べるために、Tfam

cKO 脳における ATF4 標的遺伝子の発現を調べた。Tfam cKO 脳では、P4 および P8 で ATF4 標的遺伝子の発現がコントロール脳に比較して有意に増加しており、P0 脳でも同様の傾向が認められた (図 23)。

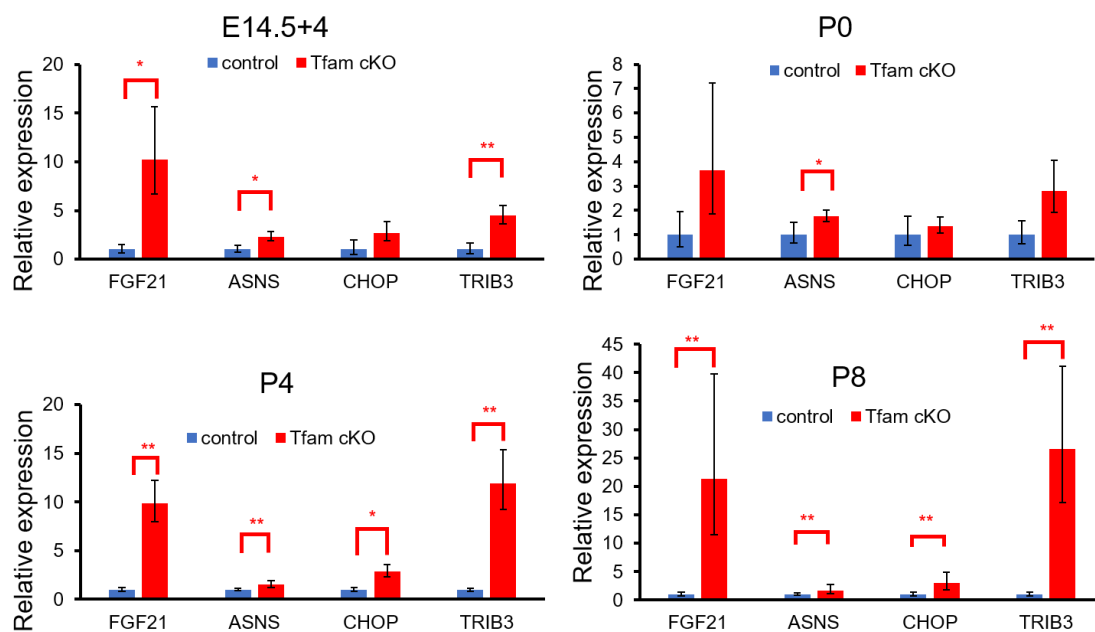


図 23 qRT-PCR による ATF4 標的遺伝子の発現解析。ニューロスフェア、P0、P4、P8 脳から Total RNA を単離した。各遺伝子の発現量は、 β アクチンの発現量を用いて正規化した。グラフは平均値 \pm SD を示す。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

以上の結果は、Tfam の欠損により mtDNA が減少し、電子伝達系の活性が低下し、エネルギー不足が促進し、活性酸素産生も減少し、それに引き続くミトコンドリアの機能不全が、ATF4 の活性化を引き起こし、ISR を誘導している可能性を示唆していた。

考察

本研究では、神経幹細胞特異的 **Tfam** 欠損マウスモデルを用いて、神経発生におけるミトコンドリアの機能と活性の役割を明らかにした。**TFAM** は **mtDNA** の維持・複製に不可欠な因子である。神経幹細胞における **Tfam** 遺伝子の不活性化により、マウス脳内の **mtDNA** のコピー数は減少し、**OXPHOS** を構成する複合体のうち **mtDNA** にコードされるサブユニットが急速に減少し、それとともに **nDNA** コードのサブユニットも不安定化し、**OXPHOS** の障害を引き起こす。**Tfam cKO** 脳では、**P0** 時点で既に **mtDNA** のコピー数はコントロール脳に比べて 10%以下であった。**Tfam cKO** 脳からの培養神経幹細胞／前駆細胞は、**mtDNA** の減少により **OCR** が低下しており、その結果、細胞の増殖や神経細胞への分化が障害されていた。神経発生において、神経幹細胞／前駆細胞での **OXPHOS** の障害とそれに引き続くミトコンドリア機能の低下は、**ATF4** 転写因子の増加による **ISR** 経路の活性化を引き起こす。この反応は脳機能の維持調整に働いていると考えられる。

Tfam cKO 脳内の **mtDNA** のコピー数は **P0** で既に有意に減少しているが、**P0** の時点で **Tfam cKO** は同腹のコントロールマウスとの間に外見上の有意な差はなく正常であるように見える。脳の組織学的、免疫組織学的解析でも **P0** の時点では区別がつかず、**Tfam cKO** 脳の異常や成長の遅れは **P4** 以降に現れ

始める。ネスチンプロモーターは E11.5 以降の神経幹細胞で発現しており、神経幹細胞に由来する全ての細胞系譜で **Tfam** 欠損による影響を受けると考えられる。**Tfam** cKO 脳の異常は胎生期の神経発生期に現れ、神経発生期における神経幹細胞のミトコンドリア機能が明らかになると予想されたが、**Tfam** 欠損による影響は P4 以降で現れることから、本モデルマウスを用いて生体内の神経幹細胞におけるミトコンドリア機能は明らかにできなかった。ニューロスフェアを用いた細胞レベルでの解析では、既に神経幹細胞／前駆細胞の mtDNA 量は大幅に低下し、OXPHOS の低下や増殖能や神経分化能の低下も明らかであることから、神経発生における神経幹細胞でもミトコンドリア機能が重要であると考えられる。この点に関しては今後の課題である。

心臓^{34,35}、骨格筋^{34,36}、膵β細胞³⁷、皮質ニューロン¹⁹における **Tfam** cKO の他のマウスモデルと同様に、神経幹細胞での **Tfam** 発現低下が、表現型として発現するまでにタイムラグがあるように考えられる。nDNA にコードされた転写産物の発現は **Tfam** 欠損によっても減少することはない、また mtDNA にコードされる転写物の発現は P0 脳で既に 20%以下になっていることから、**Tfam** 欠損によるミトコンドリア機能の低下は、mtDNA にコードされるタンパク質の安定性に依存する可能性が極めて高いと考えられる。mtDNA にコードされるサブユニットが nDNA にコードされるサブユニットとともにミトコン

ドリア内膜で複合体を形成すると、サブユニットが単独でいるよりもタンパク質の安定性が増大すると考えられる。mtDNA が減少し mRNA が減少してタンパク質の供給が減少しても、安定な複合体はある程度残存し、ミトコンドリア機能はある程度保てると考えられる。実際、nDNA にコードされる複合体 I や複合体 III のサブユニットは、Tfam cKO では減少したものの消失はしていなかった。mtDNA にコードされる複合体 IV のサブユニットである MTCO1 や MTCO2 のウェスタンブロットによる検出を複数回試みが残念ながら特異なバンドを検出することができなかった。したがって、mtDNA にコードされる転写物の減少とタンパク質の減少にどの程度のタイムラグがあるのかは、今回検証できなかった。

最近、Bartesaghi らは、培養神経幹細胞／前駆細胞における複合体 I のサブユニット NDUFA10 のノックダウンは呼吸障害を引き起こし、より解糖系に依存した状態へ代謝シフトすることを示した³⁸。面白いことに、神経幹／前駆細胞における電子伝達系の抑制にともなう解糖系へのシフトは、p53 の抑制を介して細胞増殖を促進すると報告されている。神経幹細胞／前駆細胞に関しては、Tfam cKO マウスとコントロールで脳内での明確な違いは観察されなかったが、呼吸活性が減少したミトコンドリアを持つ脳内の神経幹細胞では代謝シ

フトが起こる可能性があり、表現型が現れる以前の **Tfam cKO** マウスの神経幹細胞では代謝シフトが起こり障害を補っている可能性が考えられる。

環状 GMP-AMP 合成酵素 (**cGAS**) およびその下流のエフェクター経路である **STING** は、ウイルス感染にตอบสนองして自然免疫応答を活性化する³⁹。ミトコンドリアストレスによりミトコンドリアから **mtDNA** が放出され、放出された **mtDNA** は危険信号として作用し、**cGAS-STING** 経路を刺激して自然免疫応答を活性化させることが知られている⁴⁰。**West** らは最近、中等度の **mtDNA** ストレスが観察されるヘテロ接合性 **Tfam** マウス胚性線維芽細胞 (**Tfam^{+/+}** **MEFs**) において、ミトコンドリアから **mtDNA** が放出され、**cGAS-STING** 経路が活性化されることを示した^{41, 42}。**Tfam^{+/+}** **MEFs** では、インターフェロン刺激遺伝子 (**ISG**) および抗ウイルスシグナル伝達因子の発現が活性化される。**Tfam cKO** および **Tfam** ヘテロ接合体 (**Tfam^{f/+};Nestin-Cre⁺**) の脳や培養神経幹細胞/前駆細胞では、**ISG15** などの **ISG** の発現は活性化されていない (図 5C)。**cGAS-STING** 経路を介した **mtDNA** ストレス応答の活性化は、細胞もしくは組織によって異なっている可能性が考えられる。**Tfam cKO** の脳では、アポトーシスに先立ってミクログリアが活性化されている。神経発生期の神経幹細胞における **FIP200** の不活性化によるオートファジーの障害を示した結果⁴³と同様に、**Tfam cKO** の脳では **Ccl2** の発現が上昇しており、ミクログ

リアは Tfam 欠損細胞から分泌される何らかの因子によって遊走と活性化が促進されている可能性がある。血管内皮増殖因子(VEGF)が神経前駆細胞から分泌され、ミクログリアの活性化に関与するとの報告があり⁴⁴、VEGF の発現を qRT-PCR で調べてみたが、Tfam cKO の脳や培養神経幹細胞／前駆細胞では VEGF の発現増加は認められなかった。これらの知見は、さらなる研究が必要である。

ISR は、環境ストレスや病的状態に応じて、全般的な翻訳停止と特異的な遺伝子活性化をもたらす適応経路である^{45, 46}。この経路の鍵となる因子は ATF4 転写因子である。ATF4 mRNA の翻訳は、翻訳開始因子である eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α) のリン酸化を介して活性化され、ATF4 は蓄積し、標的遺伝子の発現を活性化することによって細胞の回復を促進する。ミトコンドリア膜電位の低下などのミトコンドリアストレスは、ISR を活性化してミトコンドリア機能を回復させる^{47, 48}。Tfam cKO の脳や培養神経幹細胞／前駆細胞では ATF4 が蓄積し、FGF21 や TRIB3 などの ATF4 標的遺伝子の発現が発現亢進する。神経発生期の神経幹細胞における Tfam 不活性化により mtDNA が欠損し OXPHOS の障害を引き起こし、Tfam 欠損細胞はミトコンドリア膜電位を維持できないことから、ISR は適応応答として誘導されていると考えられる。このことは、ATF4 を介する ISR が、神経発生期の培

養神経幹細胞や脳のミトコンドリア機能障害に応答する中心的な経路であることを示している。過剰なストレス条件下では、**ISR** がアポトーシスを誘導することから、終末期の **TFAM** 欠損マウス脳では、**ISR** がアポトーシスを誘導する方向に働いた可能性も考えられる。

以上のことから、本研究で得られたデータは、**TFAM** が神経幹細胞の機能維持に必要であり、**TFAM** が欠損すると神経発生が阻害され脳の形成に障害が生じることを示している。また、脳や神経幹細胞における **Tfam** 不活性化によって引き起こされるミトコンドリア機能障害からの回復を促進するために、**ATF4** を介した **ISR** 経路が中心的な役割を担っていることが明らかとなった。これらの結果は、神経発生や神経新生におけるミトコンドリアの健康と機能の重要性について新たな知見を提供するものである。

本研究の限界と課題

今回の研究では神経細胞に注目したが、同じ Nestin 陽性の神経幹細胞由来であるアストログリアについても、代謝シフトなどが起きていることが予想され、検証は今後の課題である。また、Cre 組換え酵素の活性をタモキシフェンの投与で調節可能なマウス系統を使用することによって、成体脳の神経新生や運動や抗うつ薬などで負荷をかけ神経新生を促進した状態での神経幹細胞のミトコンドリア機能の解析が可能であると考えられる。

Tfam cKO の脳では、ミクログリアの活性化がアポトーシスに先行して P4 の時点で認められた。ミクログリアの活性化に関与する Ccl2 は、P8 では上昇しているものの、P4 では上昇がみられなかった。ミクログリアの活性化を引き起こす他の因子の存在が示唆される。Tfam cKO の脳における炎症性サイトカインの上昇がミクログリア由来であるかどうかの確定には至っていないが、ミクログリアを単離しての解析や免疫組織染色を組み合わせることによって可能であると考えられる。

終論

本研究では、**Tfam** を不活性化することでマウスの神経幹細胞特異的にミトコンドリア機能障害を誘導したマウスモデルを用いて、神経発生過程におけるミトコンドリアの役割について解析した。**Tfam** を不活性化した神経幹細胞は、呼吸鎖活性の低下によりミトコンドリア機能障害を引き起こし、*in vivo* と *in vitro* の両方で神経の分化・成熟に障害をもたらした。**Tfam cKO** マウスの脳は主に大脳皮質第 V 層で神経細胞のアポトーシスを示し、それに先立ちミクログリアの活性化が認められた。**Tfam cKO** マウスの培養神経幹細胞では、ミトコンドリアから発生する活性酸素の減少が認められた。また、**Tfam** の欠損により **ATF4** が蓄積し、その標的遺伝子の発現が亢進した。このことから、神経発生におけるミトコンドリア機能障害により統合ストレス応答 (**Integrated stress response: ISR**) が活性化され、神経変性の進行や脳機能の低下を低減するために機能すると考えられた。従来、幹細胞では抑制されていると考えられていたミトコンドリア機能が、神経発生過程で重要な役割を担っていることを、細胞レベルおよび個体レベルで示すことができた。ミクログリアの活性化機構の解析やアストログリアにおけるミトコンドリアの役割の検証などについては今後の課題である。

謝辞

本研究は、著者が自治医科大学大学院医学研究科地域医療学系専攻脳神経外科に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻科教授川合謙介先生には担当教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、深謝の意を表します。人間生物学系 生体分子医学専攻分野 分子生化学専攻科教授 遠藤仁司先生、同教授 富永薫先生には、研究指導協力教員として研究におけるスタート地点から、実験方法のみならず、研究倫理、論理的思考法、そして本論文執筆の細部にまで厚くご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。自治医科大学学生化学講座機能生化学部門 講師 笠嶋克己先生、講師 坂下英司先生、講師 黒岩憲二先生には実験手法や研究遂行にあたり篤くご指導をいただきました。同部門研究補助員 太田恵理子氏、加藤千代子氏には、本研究におけるマウス飼育や実験機器操作、研究室管理についてご指導いただきました。自治医科大学学生化学講座機能生化学部門の各位には日頃より有益な討論、ご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。自治医科大学解剖学講座組織学部門教授 大野伸彦先生、同技師 幸喜富氏には透過型電子顕微鏡解析でご指導いただきました。自治医科大学共同実験機器センター 早川裕子先生にはフローサイトメトリーでご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり令和2年度自治医科大学大学院医学研究科研究奨励賞のサポートをいただきました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

1. Pfanner, N., Warscheid, B. & Wiedemann, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 267-284 (2019).
2. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* **11**, 102 (2020).
3. Hamanaka, R.B., Weinberg, S.E., Reczek, C.R. & Chandel, N.S. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Required for Organismal Adaptation to Hypoxia. *Cell Rep* **15**, 451-459 (2016).
4. Lee, P., Chandel, N.S. & Simon, M.C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 268-283 (2020).
5. Sorrentino, V., Menzies, K.J. & Auwerx, J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **58**, 353-389 (2018).
6. Vasan, K., Werner, M. & Chandel, N.S. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab* **32**, 341-352 (2020).
7. Gage, F.H. & Temple, S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* **80**, 588-601 (2013).
8. Paridaen, J.T. & Huttner, W.B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* **15**, 351-364 (2014).
9. Ohtsuka, T. & Kageyama, R. Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development. *Semin Cell Dev Biol* **95**, 4-11 (2019).
10. Khacho, M. *et al.* Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell* **19**, 232-247 (2016).
11. Khacho, M. & Slack, R.S. Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain. *Dev Dyn* **247**, 47-53 (2018).
12. Iwata, R., Casimir, P. & Vanderhaeghen, P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* **369**, 858-862 (2020).
13. Namba, T., Nardelli, J., Gressens, P. & Huttner, W.B. Metabolic Regulation of Neocortical Expansion in Development and Evolution. *Neuron* (2020).
14. Knobloch, M. & Jessberger, S. Metabolism and neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **42**, 45-52 (2017).
15. Kang, I., Chu, C.T. & Kaufman, B.A. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett* **592**, 793-811 (2018).

16. Ribeiro, M.F., Genebra, T., Rego, A.C., Rodrigues, C.M.P. & Solá, S. Amyloid β Peptide Compromises Neural Stem Cell Fate by Irreversibly Disturbing Mitochondrial Oxidative State and Blocking Mitochondrial Biogenesis and Dynamics. *Mol Neurobiol* **56**, 3922-3936 (2019).
17. Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D. & Larsson, N.G. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett* (2020).
18. Gustafsson, C.M., Falkenberg, M. & Larsson, N.G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* **85**, 133-160 (2016).
19. Sörensen, L. *et al.* Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci* **21**, 8082-8090 (2001).
20. Larsson, N.G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**, 231-236 (1998).
21. Tronche, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**, 99-103 (1999).
22. Shimshek, D.R. *et al.* Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* **32**, 19-26 (2002).
23. Chen, M., Takano-Maruyama, M., Pereira-Smith, O.M., Gaufo, G.O. & Tominaga, K. MRG15, a component of HAT and HDAC complexes, is essential for proliferation and differentiation of neural precursor cells. *J Neurosci Res* **87**, 1522-1531 (2009).
24. Chen, M., Pereira-Smith, O.M. & Tominaga, K. Loss of the chromatin regulator MRG15 limits neural stem/progenitor cell proliferation via increased expression of the p21 Cdk inhibitor. *Stem Cell Res* **7**, 75-88 (2011).
25. Kwan, K.Y., Sestan, N. & Anton, E.S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* **139**, 1535-1546 (2012).
26. Mukhtar, T. & Taylor, V. Untangling Cortical Complexity During Development. *J Exp Neurosci* **12**, 1179069518759332 (2018).
27. Nieto, M. *et al.* Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* **479**, 168-180 (2004).
28. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221 (2005).
29. Shintani, T., Takeuchi, Y., Fujikawa, A. & Noda, M. Directional neuronal migration is impaired in mice lacking adenomatous polyposis coli 2. *J Neurosci* **32**, 6468-6484 (2012).

30. Baker, K. *et al.* Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther* **284**, 215-221 (1998).
31. Hamanaka, R.B. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci Signal* **6**, ra8 (2013).
32. Norberg, E., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 95-100 (2010).
33. Hu, M. *et al.* ATM inhibition enhances cancer immunotherapy by promoting mtDNA leakage/cGAS-STING activation. *J Clin Invest* (2020).
34. Wang, J. *et al.* Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* **21**, 133-137 (1999).
35. Li, H. *et al.* Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3467-3472 (2000).
36. Wredenberg, A. *et al.* Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15066-15071 (2002).
37. Silva, J.P. *et al.* Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* **26**, 336-340 (2000).
38. Bartesaghi, S. *et al.* Inhibition of oxidative metabolism leads to p53 genetic inactivation and transformation in neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1059-1064 (2015).
39. Hopfner, K.P. & Hornung, V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 501-521 (2020).
40. Pérez-Treviño, P., Velásquez, M. & García, N. Mechanisms of mitochondrial DNA escape and its relationship with different metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1866**, 165761 (2020).
41. West, A.P. *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553-557 (2015).
42. Wu, Z. *et al.* Mitochondrial DNA Stress Signalling Protects the Nuclear Genome. *Nat Metab* **1**, 1209-1218 (2019).
43. Wang, C., Yeo, S., Haas, M.A. & Guan, J.L. Autophagy gene FIP200 in neural progenitors non-cell autonomously controls differentiation by regulating microglia. *J Cell Biol* **216**, 2581-2596 (2017).
44. Mosher, K.I. *et al.* Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat Neurosci* **15**, 1485-1487 (2012).

45. Pakos-Zebrucka, K. *et al.* The integrated stress response. *EMBO Rep* **17**, 1374-1395 (2016).
46. Girardin, S.E., Cuziol, C., Philpott, D.J. & Arnoult, D. The eIF2 α kinase HRI in innate immunity, proteostasis, and mitochondrial stress. *FEBS J* (2020).
47. Quirós, P.M. *et al.* Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J Cell Biol* **216**, 2027-2045 (2017).
48. Guo, X. *et al.* Mitochondrial stress is relayed to the cytosol by an OMA1-DELE1-HRI pathway. *Nature* **579**, 427-432 (2020).