

氏 名	黒 田 林太郎
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 630 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 小 坂 仁 教 授 (委 員) 高 橋 将 文 准教授 瀬 原 吉 英 講 師

論文内容の要旨

1 研究目的

神経活動には大量のエネルギー消費がとれない、ミトコンドリア病のみならず多くの神経変性疾患や加齢性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、神経活動や神経機能を正常に行うためにはミトコンドリア機能を適切に維持することが必須である。しかし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維持機構やその役割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細胞を生み出している。幹細胞は解糖系優位で電子伝達系による ATP 産生を担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。近年、神経分化にとれないミトコンドリアはダイナミックに形態変動を繰り返し維持されていることが解ってきた。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れない代謝プログラミングにおけるミトコンドリアの役割に関しては未だ不明な点が多い。

本研究では、神経発生及び神経機能におけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的とし、ミトコンドリア関連遺伝子を神経幹細胞特異的に欠損したマウスモデルを用いる。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および個体レベルで解析する。

2 研究方法

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の維持に必須であるミトコンドリア転写因子 A (Tfam) を神経幹細胞特異的に欠損させた (Tfam cKO) マウスを作製し、解析に使用した。

胎児および生後 10 日までのマウスより脳を摘出し組織病理学的検討を行なった。免疫組織染色により脳内の各細胞群の数や形態、増殖細胞や細胞死などについて評価した。脳内神経細胞のミトコンドリアの形態学的評価を透過型電子顕微鏡解析により行った。

ニューロスフェア法を用いて神経幹細胞/前駆細胞の *in vitro* の解析を行なった。胎齢 14.5 日のマウス脳より神経幹細胞/前駆細胞を分離してニューロスフェアを作製し、解析に使用した。スフェア形成能の測定や、抗 BrdU 抗体を用いた評価により神経幹細胞/前駆細胞の増殖能を評価した。神経幹細胞/前駆細胞の分化能を評価するために神経分化培地で培養し、免疫細胞染色で検出した。神経幹細胞/前駆細胞の呼吸活性と解糖能の測定は、細胞外フラックスアナライザ

ーを用いて行い、神経幹細胞／前駆細胞の活性酸素をフローサイトメトリーで解析した。脳および培養神経幹細胞／前駆細胞より DNA を抽出し、もしくは RNA 抽出後、cDNA を作製し、定量 PCR を用いて mtDNA 量や各遺伝子の発現量を測定し解析した。脳および培養神経幹細胞／前駆細胞より細胞抽出液を調整し、ウェスタンブロットで各タンパク質の発現量を検討した。

3 研究成果

神経幹細胞特異的 *Tfam* cKO マウスは出生直後は同腹のコントロールと区別がつかなかったが、生後 4 日目ごろから成長の遅延が明らかとなり、生後 10 日前後で死亡した。死亡直前の脳では神経細胞が減少し大脳皮質の菲薄化と樹状突起伸長の低下を認めた。また、神経細胞内のミトコンドリアは膨化し内部構造は粗造化していた。神経細胞死は大脳皮質第 V 層に特に集中していた。ミクログリアは死細胞が出現する以前に既に活性化していた。0 日齢や 4 日齢の脳では mtDNA のコピー数や遺伝子発現は既に低下していた。

ニューロスフェア法を用いた解析では、*Tfam* cKO マウス胎児脳由来の神経幹細胞／前駆細胞の増殖能の低下と神経分化能の著しい低下が認められ、増殖と神経分化の両面において正常なミトコンドリア機能が必要であることが判明した。細胞外フラックスアナライザーを用いた解析では、*Tfam* cKO マウス由来神経幹細胞／前駆細胞では、酸素消費速度の著しい低下と解糖系の代償的亢進が認められた。定量 PCR での解析から、*Tfam* cKO マウス由来神経幹細胞／前駆細胞では mtDNA にコードされる遺伝子の発現が減少していた。また、炎症性サイトカインや脂質代謝に関わる遺伝子の発現が亢進傾向にあり、神経幹細胞／前駆細胞においてもミトコンドリア機能維持が重要であることが解った。活性酸素産生は *Tfam* cKO マウス由来神経幹細胞／前駆細胞ではコントロールに比べ低下していた。野生型神経幹細胞／前駆細胞を活性酸素消去剤 EUK 134 で処理すると神経分化が抑制され、*Tfam* cKO マウス由来神経幹細胞／前駆細胞の神経分化能の低下は、活性酸素産生の低下に起因する可能性が示唆された。

種々の細胞内外のストレスにより統合ストレス応答 (Integrated stress response: ISR) が活性化されることから、*Tfam* cKO 脳および培養神経幹細胞／前駆細胞における ISR の活性化を解析した。ISR の中心因子である ATF4 がコントロールに比べ蓄積しており、また ATF4 の標的遺伝子の発現も亢進していた。以上の結果より、ミトコンドリア機能の低下により、脳内で ISR の活性化が引き起こされることが明らかとなった。

4 考察

mtDNA の維持に必須である *Tfam* を神経幹細胞特異的に欠損したマウスを用いて神経発生にミトコンドリア機能が重要であることが明らかとなった。当初、胎生期の段階から神経発生に異常が生じると予想したが、*Tfam* 欠損の影響は生後 4 日以降で顕著になった。脳内の神経幹細胞／前駆細胞における *Tfam* 欠損の影響は追跡できなかったが、ニューロスフェアを用いた *in vitro* の解析では、神経幹細胞／前駆細胞の増殖能も神経分化能も低下していることから、神経幹細胞／前駆細胞においてもミトコンドリア機能が重要であると考えられた。ミトコンドリア活性は mtDNA にコードされるタンパク質の安定性に依存しており、特にミトコンドリア内膜で複合体を形成したタンパク質は安定性が高いことが推測された。脳内の神経幹細胞／前駆細胞では電子伝達系複合体の減少速度が遅く、*Tfam* 欠損の影響が弱いと考えられる。

Tfam 欠損により引き起こされるミトコンドリア機能の低下は、脳や培養神経幹細胞／前駆細胞で ATF4 の蓄積とそれに続く ISR の活性化を誘導した。Tfam cKO 脳や培養神経幹細胞／前駆細胞では cGAS-STING 系は活性化しておらず、ISR の活性化がミトコンドリア機能障害に対抗する主要経路であると考えられた。ISR 経路は、ミトコンドリア機能障害による細胞機能低下からの回復を促進するために活性化されると考えられる。これらの知見は、神経発生と脳機能におけるミトコンドリアの健康維持と役割について、さらなる研究のための新たな方向性を提供するものである。

5 結論

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機能を明らかにした。幹細胞では解糖系が優位と考えられているが、本研究では神経幹細胞の維持や神経分化にミトコンドリア機能が必要であることを示した。神経幹細胞特異的 Tfam 欠損マウスの脳では神経分化や成熟が障害された。Tfam 欠損神経幹細胞／前駆細胞では、呼吸活性の低下によりミトコンドリア機能障害が引き起こされ、その増殖能や神経分化能が低下した。Tfam cKO マウスの脳では主に大脳皮質第 V 層で神経細胞のアポトーシスが認められたが、アポトーシスの出現より先行してミクログリアの活性化が起こっていた。Tfam の不活性化に起因するミトコンドリアストレスは ATF4 の蓄積を引き起こし、その下流の統合ストレス応答の活性化を誘導した。統合ストレス応答は、神経変性の進行を防御するために活性化されたと考えられる

論文審査の結果の要旨

本学位論文では、神経幹細胞におけるミトコンドリアの役割を検討するために、ミトコンドリア転写因子 A (Mitochondrial transcription factor A: TFAM) を神経幹細胞でノックアウトマウスを作成し、ミトコンドリア機能を低下させマウスの表現型解析を行った。マウスは P10 頃に死亡し、大脳皮質の菲薄化と樹状突起伸長の低下を認めていた。また電顕では機能不全を伴うミトコンドリアの膨化所見が見られた、またニューロスフェア法を用いた解析に於いて、TFAM ノックアウトマウスでは、神経幹前駆細胞の増殖能と神経分化能の低下を証明した。

これらの原因として、活性酸素除去薬を用いた実験から、活性酸素の低下によるものと推論している。また統合ストレス応答の誘導を証明し、これがアポトーシスにつながる可能性を示した。

従来神経幹細胞では、解糖系優位であり、ミトコンドリアを介した ATP 産生の意義は少ないと考えられていたが、申請者らは vivo と細胞実験を組み合わせることにより、ミトコンドリア呼吸の重要性を示し、幹細胞研究に新しい視点を提供した臨床的にも、ミトコンドリア病患者では、すでに神経幹細胞のレベルから異常が始まっていることを示唆し、ミトコンドリア病の臨床医学においても、重要な実験結果であると判断した。また用いられている実験手法は、核酸 (DNA 定量, RNA 定量)、蛋白 (免疫染色、ウェスタンブロッティング)、組織学的検討 (ゴルジ染色を含む光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡)、幹細胞実験、個体操作と分子生物学的実験から動物実験のほぼすべての領域をカバーしており、学位所得後も独立して、実験を遂行するに十分な技術も習得できていると考えられ、学位所得にふさわしい修練がうかがえる。評価者からのコメントにも、適切な訂正や補足がなされている。

以上から、本学位論文は、新規性・独創性を持ち学問的に意義深く、多方面から階層的な検討が加えられ、導かれた結果に対する考察も適切である。以上から提出された学位論文は、学位所得にふさわしいものであると判断する。

最終試験の結果の要旨

まずミトコンドリア機能と、種々の病態や個体発生、神経機能における関係性につき、現在までの歴史的な概略を提示し、次に研究に至る背景と研究を立案した動機および目的を適切に提示した。方法は、明瞭かつもれなく提示されていた。結果の提示では、蛍光画像、電顕画像等いずれも明瞭であったが、HE染色では、標本の伸展不良がやや目立ち、ウェスタンでは定量化がされていなかった。前者は、結果の解釈には影響はなく、熟練度から見て許容範囲内であると判断される。後者に関しては、学位論文の訂正で定量化を加えることにより、適切に対処した。考察については、結果から導かれる合理的な解釈がなされていた。審査委員からは、複数の質問があったが、いずれも適切に回答しており、この領域における相当数の論文を読み込んだうえで、知識を十分に吸収し、実験の意味を理解して行っていることがうかがえた。その場で応えられない質問に関しては、あいまいな返答をせずに、のちに訂正の形で対処しており、科学者としての誠実な対応であった。スライドの作成も、適切である。発表は、十分に訓練されわかりやすく、流れが整理されていた。用いた実験手法は、多岐にわたり、また緻密な操作を含む実験・観察が多い内容ではあるが、それらを4年間で習得し、結果を提示できる点からは申請者の高い研究遂行能力と、指導教官のきめ細やかな指導がうかがえる。博士課程の限られた年限内に、これだけ多彩な実験を行い、重要な所見を見出した点からも、研究者としての素養がうかがえる。博士号所得は、目的ではなくスタートラインとしてとらえ、脳外科医として、今後も臨床と研究を両立されることを願う。