

## 研究終了報告書

### 「神経難病における酸化ストレスの細胞間伝播機構の解明」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：森川 桃

#### 1. 研究のねらい

細胞集団の包括的な活性調節には NO のような化学物質の拡散が関わっていると考えられているが、その詳細は特に神経細胞集団においてまだ明らかになっていない。神経変性疾患においては多数の神経細胞がほぼ時を同じくして死滅し病態の急速な増悪がもたらされることが多く、このような多数の神経細胞が同時に死滅していく機構には細胞死シグナルの多細胞間伝播による包括的な活性調整がかかわっている可能性が高い。

神経細胞からは細胞外顆粒 (extracellular vesicles; EVs) と呼ばれる膜小胞が細胞外に放出され、他の神経細胞やグリア細胞がこれを取り込むことにより、細胞間を物質が受け渡される。この EVs を介したミトコンドリア断片 (ミトコンドリア含有小胞 mitochondria derived vesicles; MDVs) の細胞間物質輸送は、神経細胞とグリア細胞間の酸化ストレスの受け渡しにより神経細胞の恒常性の維持に必須の役割を果たしていると考えられており、その過剰や不足はシャルコー・マリー・トゥース病 (CMT 病) などの神経変性疾患や高次脳機能障害をもたらすことが予想されている。CMT 病は凹足や槌状趾といった足の変形を伴いながら、進行性にバランス感覚低下や手足の筋力低下がおこるが、根本的な治療法は未だ開発されていない。

本研究においては、CMT 病患者において新たに同定したキネシン分子モーターの変異を CRISPR/Cas9 法を用いてマウスに導入することで、遺伝子変異マウスを作成して解析を行う。キネシン分子モーターの変異により酸化ストレスが多細胞間伝播を伝播し、大量の神経細胞死が招来されて CMT 病が引き起こされるという分子メカニズムにおいて、キネシン分子モーターによる酸化ストレスの蓄積した MDVs の細胞外放出機構を解明する。

具体的には、以下の4点を達成することが狙いである。

1. MDVs という新たな神経細胞間の細胞死シグナル交換機構の存在を明らかにする。
2. 細胞「内」物質輸送を担うキネシン分子モーターが、細胞「間」の物質輸送も担っており、多細胞集団の包括的活性調整を行うことを示す
3. 神経細胞間の MDVs のやり取りの破綻が神経変性疾患を引き起こすことを示す。
4. 治療薬のない慢性疾患である神経変性疾患の分子病態の解明により、治療戦略・治療薬開発の基盤となる。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

CMT 病において、歩行障害に加えて情動行動や記憶・学習能力に異常が見られる患者が見つかり、この患者において、キネシン分子モーターの変異を新たに同定した。この CMT 病の患者から見つかった変異を、CRISPR/Cas9 法を用いてマウスに導入することで遺伝子変異マウスを作成したところ、このマウスはヒト患者と非常に類似した表現型を持つことが示された。そこでこの遺伝子変異マウスを用いて、キネシン分子モーターの神経細胞における機能

を、個体・組織・細胞・細胞外小胞の各レベルで研究を行った。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1 「個体レベルの研究」

#### 1— I. マウスの行動解析

CMT 病のヒト患者に見られた変異を CRISPR/Cas9 法を用いて導入した変異マウスと同腹の野生型マウスを解析に用いた。マウスのコロニーを増やし、野生型マウスと変異マウスを用いて①ロータロッド試験による四肢の運動協調性の評価、②オープンフィールド試験と高架式十字迷路による情動行動の評価、③スリーチャンパー社会行動試験による社会性の評価、④Y 迷路による作業記憶の評価を行い、総合的にキネシン分子モーターの変異がもたらすマウスの表現型を調べた。

その結果、この遺伝子変異導入マウスはヒト患者と非常に類似した表現型を持つことが示された。よって、この患者における病態の理解を進めるにあたり、モデルマウスとして使用できると考えられた。

#### 1— II. 電気生理学的解析

マウスの脊髄、一次運動野、海馬のスライスを用いて、HE 染色、クリューバー・バレラ染色、ボディアーン染色を行い、髄鞘の形成具合や神経細胞死の観察を行った。また、遺伝子変異マウスの行動解析で見られた異常が、グリア細胞由来 (CMT 病 I 型: 脱髄型) か神経細胞由来 (II 型: 軸索変性型) の表現型であるのかを識別するため、座骨神経の伝導速度とシグナルの振幅に注目して電気生理学的な測定を行った。

### 研究テーマ 2 「組織レベルの研究」

#### 2— I. ミトコンドリア分画解析

マウス脳のホモジェネートから濃度勾配遠心分離法によりミトコンドリア分画を抽出し、ウェスタンブロッティングによりその分画に局在するキネシン分子モーターの量を野生型と変異型マウスで比較した。ミトコンドリア分画に局在することが知られている野生型キネシン分子モーターに対し、変異型では局在が低下していることが分かった。

#### 2— II. MDV 分画解析

マウス血清から MDVs 分画を抽出し、そこに含まれる MDVs の量をウェスタンブロッティングで比較したところ、遺伝子変異マウスの血清中に MDVs の有意な増加が見られた。

### 研究テーマ 3 「細胞レベルの研究」

#### 3— I. キネシン分子モーター結合タンパク質の探索

N2A 細胞を用いてキネシン分子モーターと結合するタンパク質を、特にミトコンドリア関連タンパク質に注目して Bio-ID 法により探索した。

#### 3— II. ミトコンドリアライブイメージング

N2A 細胞と海馬一次培養系においてミトラッカー試薬とミトブライト試薬を用いた標識を行い、セミ超高解像 Airyscan 手法を用いて、細胞内でのミトコンドリアの形態と挙動を詳細に観察した。その結果、変異神経細胞においてミトコンドリアが断片化していることが分かった。

#### 3— III. Neuro2A 細胞のミトコンドリアとキネシン分子モーターのイメージング

N2A 細胞に野生型と変異型キネシン分子モーターの EGFP 蛍光タグ付き cDNA コンストラクトを導入し、ミトコンドリアと MDVs の挙動にどのような影響を与えるか、また MDVs の放出の頻度や数に変化するかを観察した。

#### 3—IV. 海馬一次培養系のミトコンドリアとキネシン分子モーターのイメージング

海馬の一次培養系においても上記の現象が見られることを確認した。

また、京都大学のアイセムス物質—細胞統合システム拠点との共同研究により、格子構造化照明顕微鏡を搭載した超解像顕微鏡システム Elyra7 (ZEISS) を用いた高解像度観察を行った。

#### 3—V. 分子モーターのノックダウン・過剰発現系の樹立とイメージング

N2A 細胞や海馬の一次培養系において見られた MDVs の動態が、実際に酸化ストレスの伝播に寄与していることを確認するとともに、その伝播にキネシン分子モーターが関与していることを証明するために、モーター欠損型コンストラクトを用いて実験を行った。

### **研究テーマ 4 「細胞外小胞レベルの解析」**

#### 4— I. 培養培地を用いた MDVs の伝播効果の検証

N2A 細胞と海馬一次培養系を用いて、細胞培養培地中に放出された MDVs 分画を抽出し、そこに含まれる MDVs の量をウェスタンブロットティングにより比較した。その際、既知の EV マーカーでもウェスタンブロットティングを行い、生化学的屬性を解析した。その結果、キネシン分子モーターが過剰発現した N2A 細胞と、変異型の神経細胞において、MDVs の培養培地中への放出が過剰になっていることが分かった。これは MDVs を介した多細胞間の酸化ストレス伝播機構の存在を示唆するものである。

#### 4— II. EVs マーカーを用いた MDVs の属性解析

MDVs 内のミトコンドリア特異的な過酸化脂質を標識し、標識 MDVs を細胞に添加することにより、酸化ストレスが伝播していることを確認した。また、細胞内の MDVs を可視化して解析するために TOM20 抗体と PDH E2/E3bp 抗体を用いた免疫細胞化学的な染色実験を行った。

#### 4— III. MDVs に含まれる核酸やタンパク質の分析

組織・細胞内の MDVs または細胞培養培地で回収した MDVs の中に含まれる物質を同定するため、プロテオーム解析を行った。

#### 4— II. MDVs の電子顕微鏡解析

海馬一次培養細胞の培養培地およびマウス血清から回収したエクソソーム分画の電子顕微鏡観察を行い、MDVs のサイズを野生型と変異型で比較した。

### 3. 今後の展開

神経細胞の生存に着目したとき大きな役割を果たしているのが、細胞内物質輸送を担うキネシン分子モーター (KIFs) である [Hirokawa, *Science* 1998]。KIFs は 45 種以上あり、それぞれが担当するカーゴと結合し、ATP の加水分解エネルギーを利用しながら、微小管の上を一方方向に動く。ATP 加水分解が行われる動力部である「モータードメイン」ほどの KIFs 分子もほぼ共通しているが、モータードメインから続く「カーゴ結合ドメイン」は KIFs によって多種多様であり、それぞれの KIFs のカーゴ選択性を決定する。

CMT 病の有病率は 10 万人あたり 40 人で世界中に約 260 万人もの患者がおり、最も頻度の高い遺伝性神経筋疾患である。原因遺伝子やリスクファクターはキネシン分子モーターも含めて 80 種類以上も特定されてはいるものの、その発症メカニズムの全体像は解明に至っておらず、根本的な治療法も未だ開発されていない [Tanaka and Hirokawa, *Trends Genet.* 2002; Ekins et al., *F1000Res.* 2015]。

そこで、今後はキネシン分子モーターの関与する CMT 病について、明らかになった分子メカニズムを標的とした、マウス個体を用いた表現型のレスキュー実験を行い、CMT 病の治療戦略の基盤の構築を目指す。

#### 4. 自己評価

2020 年度と 2021 年度については、仮説通りの結果が得られて予定通りのペースで研究を達成することができたが、2022 年度には予想外の結果が得られたため、たくさんの追加の実験が必要になった。また毎年エクソソームの研究分野で新たな指標が次々と作られており、対応しながら当初の計画を遂行するのに予想よりも時間がかかった。

2021 年度と 2022 年度にチャレンジ支援をしていただいたことで、これらの新規の指標にも対応でき、より詳細な解析が可能となった。特に、研究総括や領域アドバイザーの先生方とのディスカッションにより、研究開始当初には予定していなかった研究項目を追加することができた。これらの結果により、研究を更に深めることができた。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1 件

1. Manatsu Morikawa, Nivedita U Jerath, Tadayuki Ogawa, Momo Morikawa, Yosuke Tanaka, Michael E Shy, Stephan Zuchner, Nobutaka Hirokawa. A neuropathy-associated kinesin KIF1A mutation hyper-stabilizes the motor-neck interaction during the ATPase cycle. *The EMBO Journal* 2022 41(5) e108899

CMT 病患者家系で kinesin3 の一塩基変異を同定した。この変異型 kinesin3 は軸索輸送スピードが野生型よりも 20% 低く、カーゴの軸索局在も損なわれていた。X 線結晶構造解析と定量的質量分析を行ったところ、変異型 kinesin3 ではモータードメイン内に過剰な正電荷が生じ、分子内相互作用が異常に強くなり、分子の構造変化が妨げられていた。この結果カーゴの輸送が障害され、CMT 病を発症すると示唆された。

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表: 2 件



第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2022 年 3 月 27 日

森川桃, 森川真夏, 岩田卓, 田中庸介, 廣川信隆

「キネシン分子モーターの変異によるシャルコー・マリー・トゥース病の基盤となる神経細胞の機能異常」

第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2023 年 3 月 20 日

森川桃, 岩田卓, 森川真夏, 田中庸介, 廣川信隆

「神経難病におけるキネシン分子モーターの神経細胞内での動態解析」

