

# Oxygen-glucose deprivation decreases the motility and length of axonal mitochondria in cultured dorsal root ganglion cells of rats

Cell Mol Neurobiol. 2022. doi: 10.1007/s10571-022-01247-y

Kikuchi S, Kohno T, Kojima T, Tatsumi H, Ohsaki Y, Ninomiya T

**要旨** 神経細胞に対する低酸素-低グルコース (OGD) は、虚血モデルとして用いられる。本研究は、ラット脊髄神経節初代培養細胞および遺伝子工学技法を用いて、OGD が神経軸索のミトコンドリア (Mt) の動態にどのような影響を与えるのかを検討した。結果、OGD 暴露の 6 時間後に停留 Mt の長さが有意に減少し、軸索内の球状 Mt の割合が増加した。停留 Mt の長さが減少したのは、輸送 Mt の停止、Mt の分裂および停留 Mt 自身の短縮であることを明らかにした。これらの現象は軸索変性および細胞死よりも先行して観察されたことから、Mt が治療の対象となることが考えられた。

## 1. はじめに

末梢循環障害は、種々の臓器に重篤な影響をあたえる。神経系における循環障害は中枢神経系、末梢神経系にかかわらず重篤な障害を引き起こす。神経細胞は細胞体と軸索、樹状突起からなり、糖尿病などに起因する末梢循環障害でみられる末梢神経障害は軸索の障害であると考えられる。近年、軸索内のミトコンドリア (mitochondria, Mt) の動態変化が軸索変性に先立って観察されることが報告され、注目されている<sup>1-3)</sup>。今回、我々は、虚血モデルとして用いられる低酸素-低グルコース (oxygen-glucose deprivation, OGD) 暴露をおこない、ラット脊髄神経節初代培養細胞の軸索における Mt の動態を観察した。

## 2. 方法

胎生 18 日のラット胎仔より脊髄神経節を取り出し、培養に用いた。軸索内のミトコンドリアを可視化するために、赤色蛍光タンパクである DsRed-2 遺伝子に Mt 移行シグナル遺伝子を付加したものをレンチウイルス内に構築し、実験に用いた。培養 4 週間後にレンチウイルスを用いて遺伝子を導入し、さらに 2 週間培養した。合計 6 週間培養した神経細胞の軸索内 Mt は、小型インキュベーターを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察し、タイムラプス像を得た。通常の培地、無糖培地、低酸素発生装置を用いて対照 (control, Cont) 群、OGD 暴露群に分け、それぞれの刺激前 (Cont pre, OGD pre) と刺激暴露後 1 時間毎に各 20 分間、暴露後 6 時間までタイムラプスイメージを取得した (Cont 1h-6h, OGD 1h-6h)。得られたデータより、Fiji を用いて kymograph を作成し、輸送 Mt の数および、停留 Mt の長さを計測し、比較

に用いた。タイムラプス観察後、試料は anti-neurofilament protein を一次抗体とした免疫組織化学染色法により神経軸索を染色、観察し、腫脹などの軸索変性がない事を確認した。より詳細な Mt の形態を観察するため Cont および OGD 6h について、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) を用いて神経細胞核および、軸索内 Mt を観察した。神経細胞核は形態学的観察より、染色質の凝集などが無いことを明らかにし、6 時間の OGD 暴露では、apoptosis などの神経細胞死が起こらないことを確認した。軸索内 Mt はクリステなどの微細構造を観察するとともに、Fiji を用いて aspect ratio [long axis/short axis] を算出した。統計解析ソフトは R を使用し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および、Bonferoni 法を用いて、有意差の検定を行った。

## 3. 結果

輸送 Mt 数は、OGD 刺激 1 時間後に有意に減少し、その後も増加することはなかった (図. A, B)。輸送 Mt は一般的に停留 Mt よりも短い傾向にある。停留 Mt の長さは OGD 6h で有意に減少した (図. C)。また、停留 Mt の長さが有意に減少した原因の観察において、① Mt の輸送が阻害され、停留 Mt となる、② 停留 Mt の分裂 (図. D)、③ 停留 Mt 自身の短縮 (図. E)、であることが観察された。さらに詳細な解析を行うため、TEM を用いて Cont および OGD 6h の軸索内 Mt を観察した結果、クリステの破壊などはみられなかったが、aspect ratio を計測した結果、6 時間の OGD 暴露により、aspect ratio の値が小さなることが明らかとなった。aspect ratio の減少は、Mt の形状が Cont で多数を占める楕円形ではなく、より

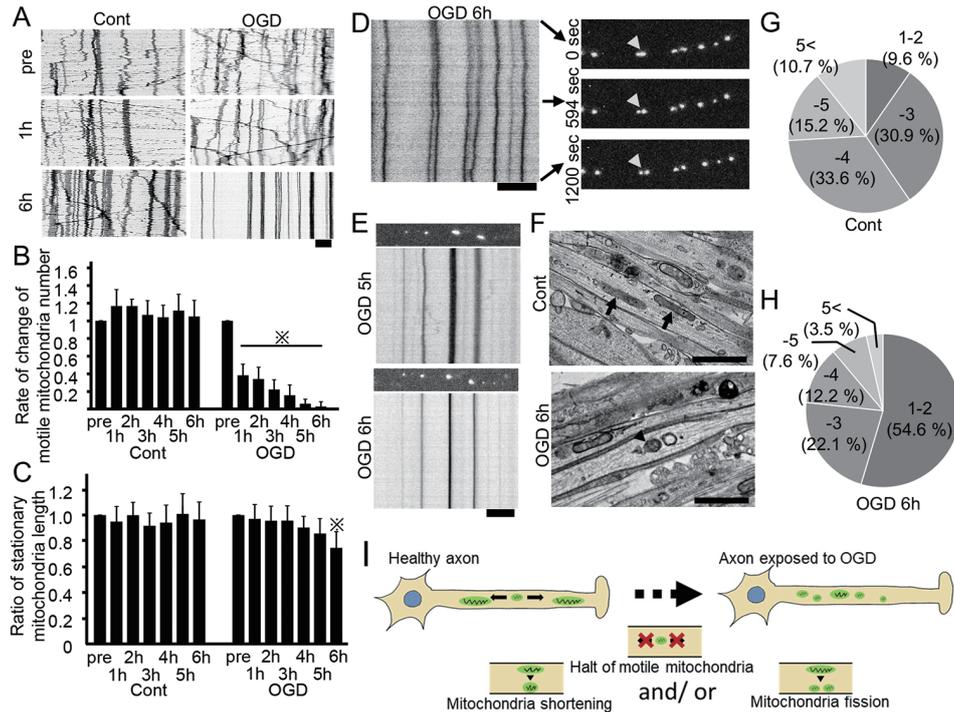


図 A. タイムラプスイメージングより作成したkymograph. B. ContおよびOGD暴露による輸送ミトコンドリア数の経時的変(※,  $P < 0.01$  v.s. pre). C. ContおよびOGD暴露による停留ミトコンドリア長の経時的変化(※,  $P < 0.05$  v.s. pre). D. OGD暴露により観察された停留ミトコンドリアの分裂(fission)像(矢頭). E. OGD暴露により観察された停留ミトコンドリアの短縮(shortening). F. ContおよびOGD暴露群の軸索内ミトコンドリアの電子顕微鏡像(Cont, 矢印; OGD 6h, 矢頭). G. Contにおける軸索内ミトコンドリアの aspect ratio の割合. H. OGD暴露における軸索内ミトコンドリアの aspect ratio の割合. I. OGD暴露により誘導される軸索内ミトコンドリア長の減少の原因をまとめた模式図. スケールバー; A, D, E=10  $\mu$ m, F=1  $\mu$ m

球形に近くなっていることを示しており、6時間のOGD暴露により、軸索内では球形のMtの割合が多くなることが明らかとなった(図. F-H).

#### 4. 考察

軸索内Mtにおいて、コバルトイオンやカップサイシン刺激がMtの輸送を阻害し、停留Mtの長さを短くするのはすでに報告されている<sup>2, 3)</sup>。今回、我々は、より一般的な障害である虚血モデルとしてOGDを採用し、培養神経細胞の軸索において、同様の知見を得ることができた。また、停留Mtの長さが減少する原因として、①輸送Mtの輸送停止(halt)、②Mtの分裂(fission)、③停留Mt自身の短縮(shortening)を明らかにした。これらの原因が、OGD暴露により、単独あるいは複数の組み合わせで作用することによって、球形の軸索内Mtの割合が多くなることを明らかにし、OGD暴露による軸索内Mtの病理学的変化として観察することができた(図. I)。この軸索内Mtの変化は、軸索変性や神経細胞死がおきる前に観察された。これらの結果は、虚血による神経軸索障害に先立って軸索内Mtの動態が大きく変化することが明らかになったことに加え、軸索内Mtを球状化させる3つの要因について分子レベルで明らかにする必要があるとともに、軸索内ミトコンドリアが治療ターゲットになる可能性を示唆した。

本内容および図はSpringer Natureより許可(License Number 5357530001292)を得て一部を和訳し、図の配置等を変更し転載した。

#### 参考文献

- Bastian C, Zaleski J, Stahon K, Parr B, McCray A, Day J, Brunet S, Baltan S. NOS3 inhibition confers post-ischemic protection to young and aging white matter integrity by conserving mitochondrial dynamics and Miro-2 levels. *J Neurosci* 2018; 38: 6247-6266.
- Chiang H, Ohno N, Hsieh YL, Mahad DJ, Kikuchi S, Komuro H, Hsieh ST, Trapp BD. Mitochondrial fission augments capsaicin-induced axonal degeneration. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 81-96.
- Kikuchi S, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, Tatsumi H. Cobalt inhibits motility of axonal mitochondria and induces axonal degeneration in cultured dorsal root ganglion cells of rat. *Cell Biol Toxicol* 2018; 34: 93-107.

#### 菊池 真

略歴

2001年 札幌医科大学保健医療学部 卒業  
 2005年 札幌医科大学医学部解剖学第一講座 助手  
 2006年 札幌医科大学大学院保健医療学研究科 修士  
 【博士(理学療法学)】  
 2007年 札幌医科大学医学部解剖学第一講座 助教  
 2016年 同 講師  
 2022年 同 准教授