

学位論文要旨

西暦 2023 年 1 月 11 日

学位申請者

(中村 朱里) 印

学位論文題目

神経細胞のコエンザイムQ量増加因子の探索とその役割の解析

学位論文の要旨

神経細胞が神経突起を伸長させるには、ミトコンドリアが突起の末端へ輸送され、そこでATPが産生される必要がある。コエンザイムQ(CoQ)はミトコンドリアでATPを作るための必須な因子の一つである。

CoQには大きく2つの役割があり、一つは前記のとおりであり、もう一つは抗酸化物質としての役割である。CoQは生体内で合成される。生体内におけるCoQ量は疾患や、加齢とともに減少することが報告されている。CoQの合成酵素遺伝子の変異により神経障害を発症することが報告されている。例えば、CoQ合成酵素の一つであるPDSS2の遺伝子変異によりリー症候群が発症する。多系統萎縮症患者の遺伝子を調べたところCOQ2の遺伝子変異が報告されている。

神経系におけるCoQの役割が注目されているものの、正常な神経細胞におけるCoQの挙動には不明な点が多く残されている。単一種類の神経細胞を用いてCoQの量やその役割について解析された報告は少ない。例えば、神経細胞への分化前後でのCoQ量の変動や、神経細胞培養時のサプリメント有無によるCoQ量の変動は不明である。また、脳へはCoQが取り込まれにくいことが報告されている。神経細胞のCoQ量増強メカニズムを解明し、CoQ投与に寄らない方法での神経細胞のCoQ量を増やす手法の探索が求められる。

本研究では、神経細胞のCoQ量とその増加因子の探索をおこなった。まず、使用する細胞種の選定を行った。iPS細胞やニワトリの初代培養細胞などを用いることも検討し

た。しかし、CoQ量を測定するためには 2.5×10^6 個と大量の細胞数が必要であることや、神経細胞以外の細胞の混入を防ぐ必要がある。これらのことから、本研究では単一種類の大量培養が可能であり、神経細胞モデルとして古くから用いられているPC12細胞を主に使用し、検討を行った。PC12細胞の分化前後のCoQ量については、第2章で述べた。神経細胞内CoQ量増加因子の探索として、神経細胞培養サプリメントに着目し、これについては第3章で述べた。

第2章では、神経細胞様への分化による細胞内CoQ量の値と、CoQ量の変動する機序についての検討をした。PC12細胞は神経成長因子(NGF)を投与することにより、交感神経様細胞に分化する。NGF投与前後の細胞内CoQ量を比較した。結果、NGF投与後にCoQ量が劇的に増加した。NGFの投与期間に比例し、CoQが増加していることも確認した。NGF投与によりミトコンドリア内CoQ量も増加していた。一方で、CoQ合成と一部経路を共にするコレステロール(FC)量については変動が見られなかった。分化によるCoQ量の増加の生理的意義の解明を試みるために、CoQ量を低下させた細胞モデルを樹立した。CoQ量を低下させる試薬として、CoQ合成酵素の一つであるCOQ2に対し競合阻害する試薬である4-ニトロ安息香酸(4-NB)を用いた。COQ2遺伝子変異を持っている多系統萎縮症患者の発症年齢が40代であり、発症までに長い年月があることから、COQ2に対し競合阻害する4-NBの投与は一過性ではなく、長期間の(本研究では11ヶ月投与した)ものを使用した。この長期間CoQ量を低下させた細胞モデルにNGFを投与し分化させた。結果、Control細胞と比較して、4-NB投与細胞の神経突起長が短くなっていることを見出した。神経細胞の分化マーカーの遺伝子発現量も検討した。分化マーカーには成長関連タンパク質43(GAP-43)とチロシンヒドロキシラーゼ(TH)を用いた。GAP-43は、神経突起を伸長させる際に発現する遺伝子であり、THはチロシンからドーパミンを産生する過程において発現する遺伝子である。いずれも神経分化の際にこれらの遺伝子発現量が上昇することが知られている。これらの遺伝子発現量はNGFを投与した4-NB投与細胞株において低下していた。以上の結果から、神経細胞が分化する際にCoQ量が増加すること、またこの増加は、神経突起の伸長に不可欠であることが示された。

CoQが神経分化に重要であることが示されたことから、次に、神経細胞のCoQ量を増加させる因子について検討した。サプリメントとしてのCoQの投与は多用されているが、経口投与したCoQは脳へ取り込まれにくいことが既に報告されている。そこで、神経細胞のCoQ量を増加させる因子と、その機序についての検討を行った。CoQ増加因子として着目したのは、トランスフェリン・インスリン・プロゲステロン(TIP)である。TIPは、これを含む無血清培地が、さまざまな神経系組織からの細胞の培養に有用であることが示されている。TIPをPC12細胞に投与した。未分化のPC12細胞へのTIP投与は細胞内CoQ量を増加させた。第2章で示したようにNGFの投与も細胞内のCoQ量を増加させたが、NGFとTIPの同時投与を行っても相加効果は認められなかった。インスリンのみの投与においても、PC12細胞内CoQ量の増加が観察されたが、トランスフェリンとプロゲステロンの

両方を投与したほうが、細胞内CoQ量の増加を促進する傾向が見られた。TIPによるCoQ増加のメカニズムを調べるために、ミトコンドリアに局在するCoQ合成酵素の最終ステップの遺伝子(coq1~coq9)の発現量を調べたが、これには変化が見られなかった。

FC量も解析した。TIP投与によりFC量が低下した。中でもFC量はプロゲステロンによって抑制されることを見出した。プロゲステロン投与によるコレステロールの低下は、CH0, HepG2細胞などで報告されている。本研究により神経系のPC12細胞でもプロゲステロンの投与によりコレステロール量が低下することが確認された。

CoQ量が低下している細胞へ、TIPの投与がCoQ増加に有用であることを確かめるために、CoQ合成阻害剤である4-NBを用い、CoQ量低下細胞モデルを樹立した。CoQ量低下細胞モデルに、TIPの投与を行ったところ、この細胞でもCoQ量が増加したことを見出した。CoQ量の低下が、分化による神経突起長を減少させていたことから、CoQ量低下細胞モデルへのTIP投与が、分化による神経突起長の減少や、分化マーカーの遺伝子発現量の減少が抑えられているかを今後測定していく必要がある。

総括として、細胞内CoQ量の重要性について議論した。神経細胞の分化時においても、TIPの投与においても細胞内CoQ量が増加したことが示された。しかし、どちらの場合においてもミトコンドリアに局在するCoQ合成酵素の最終ステップの遺伝子(coq1~coq9)の発現量には変化が見られなかったことから、CoQ量増加メカニズムについては未解決である。CoQ量が増加した可能性には次のことを考察している。一つは、CoQ合成酵素はCoQ-synthomeと呼ばれる複合体を形成し、CoQを効率的に合成していることが示唆されていることから、神経細胞分化時のCoQの増加も、TIP投与によるCoQ増加も、これらの複合体形成に何らかの影響を与えている可能性があることである。もう一つは、CoQの合成は主にミトコンドリアで行われているが、ゴルジ体や小胞体においても合成されていることが報告されており、これら細胞小器官でのCoQ合成が亢進されている可能性がある。

本研究において、神経細胞が分化する際に細胞内CoQ量が増加することを発見した。そして、神経細胞内CoQの減少が、神経突起の伸長を妨げることを見出した。

脳の萎縮はこれまで神経細胞の細胞死であると考えられてきたが、近年、神経突起長の減少も脳が萎縮する原因の一つであると報告された。加えて、COQ2遺伝子に変異を持つ患者から作製されたiPS細胞をニューロンに分化させた報告では、神経突起タンパク質であるTAUが減少していた。本研究の結果よりCoQの欠乏が神経突起の伸長に関与していることから、細胞内CoQ量を増やすことは、神経突起長の減少における症例の改善に有用である可能性がある。

一方で、CoQの減少が報告されているパーキンソン病や多系統萎縮症や、モデル動物ではCoQ投与により改善報告のあったアルツハイマー病やハンチントン病の患者へのCoQ投与を行った臨床実験では、有意な差を持って回復した例はほとんどない。その理由の一つとして血液脳関門(BBB)の存在がある。CoQはBBBを通過しにくく、CoQの投与に寄

らない、細胞内CoQ量を増加させる因子が必要である。本研究では神経細胞培養サプリメントにも含まれている物質のTIPの投与が、細胞内CoQ量を増加させたことも発見した。TIPの投与によりCoQ量低下細胞モデルの細胞内CoQ量も増加させた。TIPはBBBを通過することが報告されている。このため、TIPによるCoQ増加効果が、CoQの欠乏が報告されている神経疾患に対し有用な効果を示すことが期待される。

S u m m a r y

Applicant for degree: 11/01/2023

Akari Nakamura

Title of thesis :

Study on the fluctuations in intracellular CoQ levels in PC12 cells and their physiological significance

Coenzyme Q (CoQ) is a substance synthesized in vivo, and genetic mutations in CoQ synthase have been reported to cause neurological diseases. CoQ supplementation is recommended, but it is known that CoQ does not easily reach the brain from the blood. Although the role of CoQ in the nervous system has been the focus of much attention, the behaviour of CoQ in normal neurons remains unclear. Few reports have analysed the amount of CoQ and its role in the nervous system using a single neuronal cell line. It is not known how the levels of CoQ changes before and after differentiation into neurons, or how the levels of CoQ changes with supplements during neuronal cell culture.

In this study, level of CoQ in neuronal cell line is studied. First, the level of CoQ in the process of differentiation into neural cells was studied. PC12 cells, a well-known neuronal cell model, differentiate into sympathetic-like cells when treated with nerve growth factor (NGF). Administration of NGF increased intercellular CoQ levels. Administration of CoQ biosynthesis inhibitor reduced cellular CoQ levels. CoQ reduced cellular model exhibited reduced neurite outgrowth. Thus, increased CoQ levels are important in neural differentiation. This result derived us to search the factor to increase cellular CoQ levels. As a result, it was found that the administration of transferrin-insulin-progesterone (TIP) increased cellular CoQ levels.

In conclusion, it was found that intracellular CoQ levels increase during neural cells differentiation, and that a decrease in neural cells CoQ interferes with the degree of neurite outgrowth. It was discovered that TIP to increase intracellular CoQ levels without CoQ supplementation.