

運動による認知症発症予防効果にかかわる ミトコンドリア機能調節因子と機序の解明

小 林 天 美*

THE POTENTIAL MITOCHONDRIAL REGULATORY FACTORS UNDERLYING THE EFFECTS OF EXERCISE ON DEMENTIA ONSET

Ami Kobayashi

Key words: mitochondria, respiratory chain supercomplex, FRET, miRNA, dementia.

緒 言

運動に伴う生体内の分子的变化の 1 つとして、脳実質内のミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能亢進が報告されている^{5,7)}。この呼吸鎖複合体は、複合体 I、II、III、IV の 4 つから構成され、酸化のリン酸化によりアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) 合成酵素の働きに必要なプロトン濃度勾配を生成し、生命活動に必要なエネルギーである ATP 産生を担っている。外膜と内膜という 2 枚の脂質膜を有しており、真核生物では内膜に酸化のリン酸化を担う呼吸鎖複合体が配列している。呼吸鎖複合体のうち、複合体 I、III、IV は複合体同士が結合し更に高次の超複合体を形成することが報告されている²⁾。複合体に障害が生じると、ATP 産生の低下だけでなく過剰な活性酸素が生成され、酸化ストレスが引き起こされる。アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease; AD) の患者の脳では複合体 I と IV の機能と発現がともに低下し、ミトコンドリア機能も低下することが報告されている^{1,6)}。呼吸鎖複合体とミトコ

ンドリア機能に対する運動効果を評価する目的で、AD モデルマウスをトレッドミルで一定時間の運動を数週間継続させた結果、脳実質内の複合体 I と IV ならびに ATP 合成酵素の機能が増強され、ミトコンドリア機能の改善と認知機能の向上が観察された⁹⁾。一方で、運動により AD モデルマウスの脳実質内の複合体の発現量自体は変わらないことが報告されている³⁾。複合体の発現量に変化なく、機能亢進のみに寄与する現象として複合体 I、III、IV 同士の結合に伴うミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成が挙げられる⁴⁾。運動に伴うミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成促進とミトコンドリア機能亢進の報告は、ヒトの骨格筋内では既に複数あるが、脳に関する研究報告はほとんどない。ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成を定量する手法としては、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を活用したライブイメージングによる FRET シグナルによる定量法⁴⁾ が確立されている。そこで、本研究では、運動に伴い脳内で変動し、かつ認知症発症患者の脳検体において有意差がみられる miRNA による神経細胞のミトコンド

* ハーバード大学医学部 Harvard Medical School, Boston, USA.

リア呼吸鎖超複合体形成に及ぼす影響を評価した。なお、当初予定していたマウスを用いた運動介入研究に代わり、ヒト脳検体および iPSC 由来神経細胞を用いた分子生物学的解析を中心に研究を遂行した。

方 法

A. ヒト脳検体

凍結保存されたヒト死後脳組織試料は、Harvard Brain Tissue Resource Center より提供を受けた。本研究における試料の使用は、ハーバード大学医学部附属病院 Brigham and Women's Hospital の倫理審査委員会 (Institutional Review Board) の方針および承認に従って実施した (承認番号: 2016N000113)。

B. 細胞培養

SH-SY5Y 細胞は、37°C、5 % CO₂ 条件下で、Advanced DMEM/F-12 (10% FBS, 2 mM L- グルタミン, ペニシリン - ストレプトマイシンを含む) を用いて培養した。安定した細胞内導入を確立するため、クローンは G418 (Sigma) を 800 µg/mL の濃度で使用して選択した。ヒト iPSC 由来神経細胞は、96ウェルプレート (Corning) をマトリゲル (354234, Corning) 溶液 (DMEM/F-12中0.2 mg/mL) とポリオ/Laminin で37°Cで1.5時間コーティングした。その後、マトリゲル溶液を完全に除去し、PBS (Gibco) を加えた。プレートとディッシュは使用直前に37°Cでインキュベートした。凍結保存された4日目の iPSC 由来神経細胞は、再懸濁メディアで解凍した。このメディアは、NBM (neurobasal medium, 0.5x MEM-NEAA, 1 x GlutaMAX, 0.3% デキストロース)、1:50 B27、1:10000 DOX、プエロマイシン、1:1000 BDNF/CNTF/GDNF、1:1000 ROCKi (StemCell Technologies) で構成され、解凍を促進するために温水槽に入れた。チューブを逆さまにして優しく混ぜた後、トリパンブルー (Bio-Rad) を用いて生存細胞濃度を測定した。細胞は遠心分離 (250 g, 5 分, 室温) し、4 日目のメディアで再懸濁し、 5×10^4 cells/cm² の密度でプレートに播種した。7 日目、10 日目、14 日目、18 日目には、培養済みメディアの 3 分の 2 をメディア (NBM, 1:50

B27, 1:10000 DOX, プエロマイシン, 1:1000 BDNF/CNTF/GDNF) で交換した。使用した iPSC ラインは、MAPT P301L ドナー (ドナー ID: F0510) 由来のもので、CRISPR/CAS9 を用いて MAPT P301S に変異させたもの (F0510.2 Δ3B5) または MAPT WT に修正したもの (F0510.2 Δ3B3,4, E10) である。iPSC 由来神経細胞は、ハーバード大学医学部附属病院 Brigham and Women's Hospital 倫理審査委員会の審査と承認を受けて生成された (承認番号: 2016N000114)。

C. RNA の抽出

5 mL シリンジと 18 G、23 G、26 G の針を用いて組織を Trizol (Invitrogen) の中でホモジェナイズした。Total RNA を抽出し、RNA quality は Thermo Scientific Nanodrop 1000 分光光度計を使用して確認した。

D. プラスミドの構築と細胞内導入

ユビキノール - シトクロム c 還元酵素 6.4 kDa サブユニット (UQCRI1) をコードするプラスミドは、過去に報告されたように AcGFP と融合した。NADH- ユビキノン酸化還元酵素サブユニット B8 (NDUFB8) を AcGFP と融合したプラスミドは、ヒト NDUFB8 を哺乳類発現ベクター pAcGFP1-N1 (Clontech) にサブクローニングすることによって構築された。NDUFB8 のコーディング領域は、ヒト乳がん細胞株 MCF7 の cDNA から次のプライマーセットを用いて増幅した:

NDUFB8, Forward: 5'-CCCCAGCTCGCCATGGCGCGGTGGCCAGGGCC-3'

NDUFB8, Reverse: 5'-GGGGTACCCCGATCTCATAGTGAACCAACCCGC-3'

シトクロム c オキシダーゼサブユニット 8A (COX8A) または ATP 合成酵素 F1 サブユニットガンマ (ATP5F1c) を DsRed-Monomer と融合させたプラスミドは、以前に構築した AcGFP と融合したタンパク質をコードするプラスミドから蛍光分子を変更することによって構築した。タンパク質のコーディング領域は、哺乳類発現ベクター pDsRed-Monomer-N1 (Clontech) にサブクローニングされた。発現ベクターのトランスフェクションは、細胞を播種してから 24 時間後に FuGENE HD (Promega) を使用して、製造元の指示に従っ

て行った。

E. FRET signal の定量

AcGFP および DsRed-Monomer を共発現する細胞を96ウェルプレートで培養し、IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) および IN Cell Investigator 画像解析ソフトウェアバージョン1.6.2 (GE Healthcare) を使用して FRET 信号を定量した。細胞は検出の24時間前に化合物で処理、または48時間前に siRNA でトランスフェクションされた。AcGFP (励起488nm, 発光522nm) および DsRed-Monomer (励起561nm, 発光605nm) の蛍光信号と生の FRET 信号 (励起488nm, 発光605nm) は、1 ウェル当たり12の ROI で取得された。AcGFP 信号が生 FRET 信号に及ぼすクロストークを評価するため、NDUFB8-AcGFP のみを安定的に発現する細胞を488nm のレーザー波長で励起し、605nm で発光を検出した。この実験に基づいて、以下の式におけるクロストーク係数 (α) を決定した。次に、DsRed-Monomer の488nm でのクロス励起を評価するため、COX8A-DsRed-Monomer のみを安定的に発現する細胞を488nm のレーザー波長で励起し、605nm で発光を検出した。この実験に基づいて、以下の式におけるクロス励起係数 (β) を決定した。補正 FRET (cFRET) 値は次のように計算された: cFRET = (生の FRET 信号強度) - $\alpha \times$ (ドナー信号強度) - $\beta \times$ (アクセプター信号強度)。化学物質または siRNA が FRET 信号に与える影響を評価するために、cFRET 値はドナー信号強度で割った (cFRET / ドナー)。 β -lapachone (4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione, Sigma) は cFRET / ドナー高値と相関して細胞内の呼吸鎖超複合体形成を促進することが既に確認されており⁴⁾、本実験での陽性コントロールとして使用した。

F. 神経細胞生存率アッセイ

ヒト iPSC 由来神経細胞は、15000細胞/cm² の密度で播種し、96ウェルプレートで3週間培養した。処理後、細胞生存率は AlamarBlue HS Cell viability 試薬 (DAL1025, Life Technologies) を 1:10 の希釈で使用して測定した。メーカーの指示に従い、37°C で4時間インキュベーション後、Promega GloMax 96マイクロプレートルミノメー

ターを使用して、AlamarBlue[®] の吸光度を570 nm で測定し、600 nm を参照波長として使用した。

G. 神経突起の長さおよび神経突起分岐点の測定

神経細胞イメージングは IncuCyte[™] Live-Cell Imaging System (Essen BioScience) を使用して行った。細胞の密度、細胞体数、神経突起の長さ、および分岐点は IncuCyte[™] ソフトウェアを使用して監視および定量した。

H. マイクロアレイ

Total RNA は脱リン酸化され、3' 末端から残留リン酸および環状リン酸基が除去され、3-OH 末端が露出した。反応は70°C で3分間加熱して終了し、急速に氷上で冷却したのち、サンプルは100°C で変性させ、T4 RNA リガーゼを使用して RNA 末端標識を行った。このとき、50 mM の pCp-Cy3/Cy5、リガーゼバッファー、および BSA を使用し、16°C で一晩インキュベーションした。その後、標識された RNA はヒト/マウス小 RNA マイクロアレイ (GPL31220/GPL31221, Arraystar) にハイブリダイズし、スライドは Agilent G2505C マイクロアレイスキャナー (Agilent) でスキャンした。マイクロアレイデータは Agilent Feature Extraction Software (バージョン11.0.1.1) を使用して処理し、原始信号強度は対数2変換され、Agilent Technologies GeneSpring GX v12.1ソフトウェアパッケージ (バージョン867 11.0.1.1) を使用してクォンタイル正規化した。「Present」(P) または「Marginal」(M) としてフラグ付けされたプローブセットを用いた。

I. Small RNA sequencing

シーケンシングデータは Sequence Read Archive および ArrayExpress から取得し、各ライブラリ構築プロトコルに従ってアダプター配列を除去するためにトリミングした。アダプターのトリミングと汚染配列 (UniVec) の除去後、リードは順次、リボソーム RNA (rRNA)、転移 RNA (tRNA) および tRNA 断片 (tRF)、マイクロ RNA/snoRNA/scaRNA、piRNA、最終的にタンパク質コーディング mRNA、長鎖非コーディング RNA (lncRNA)、および miRNA ヘアピン reference にアライメントされた。miRNA の reference アノテ

ションは RmiRBase から取得した。この多段階のアライメントワークフローを使用した結果、サンプル間でリードの90~95%が正常にマッピングされた。差次的発現解析は DESeq 2 を使用して、マッピングされた総リードに基づく正規化で実施した。統計的有意性は偽発見率 (FDR) < 0.05、Fold Change > 1.5 または < 0.5 ($|\log_2 \text{Fold Change}| > 0.585$) として定義した。

結 果

A. 運動に伴い変動し、かつ神経細胞内のミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成を制御する miRNA の同定

運動に伴い脳内で変動する miRNA⁸⁾ について複数の論文報告が既にされている。また、運動が AD モデルマウスの脳内ミトコンドリア機能を改善し、認知機能を向上させるという報告^{9,3)} もあることから、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御にかかわる miRNA (図 1) を検討した。複合体 I のサブユニットである ND1、複合体 III のサブユニットである CYTB、更に複合体 IV のサブユニットである COX3 を制御することで知られている miR-1、miR-21、miR-5787 のほか、ミトコンド

リア呼吸鎖超複合体形成を制御する miR-663a を同定した。

B. 認知症患者の脳組織における miRNA の変動解析

AD 患者において低下している miRNA として miR-132 が多数の既報により確立されている。本研究で使用した AD 患者の側頭葉における miR-132 の発現レベルも有意に低かった (図 2)。そのうえで、small マイクロアレイを用いて上記で同定した miRNA の発現レベルをコントロール群と AD 患者群で比較したところ、AD 患者における miR-1 の有意な低下ならびに miR-663a の有意な上昇がみられた (図 2)。

AD とともに、タウを主病変とするタウオパチーに分類される認知症として前頭側頭葉型認知症 (frontotemporal dementia; FTD) が挙げられる。FTD 患者の脳検体を用いた small RNA-seq dataset を再解析したところ、miR-21 の発現レベルはコントロール群と FTD 患者群で特に有意差はみられなかったが、miR-1 の発現レベルは有意に低下していた (図 3)。一方で、miR-663a、miR-5787 は検出されなかった。運動により変動しミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御にかかわる

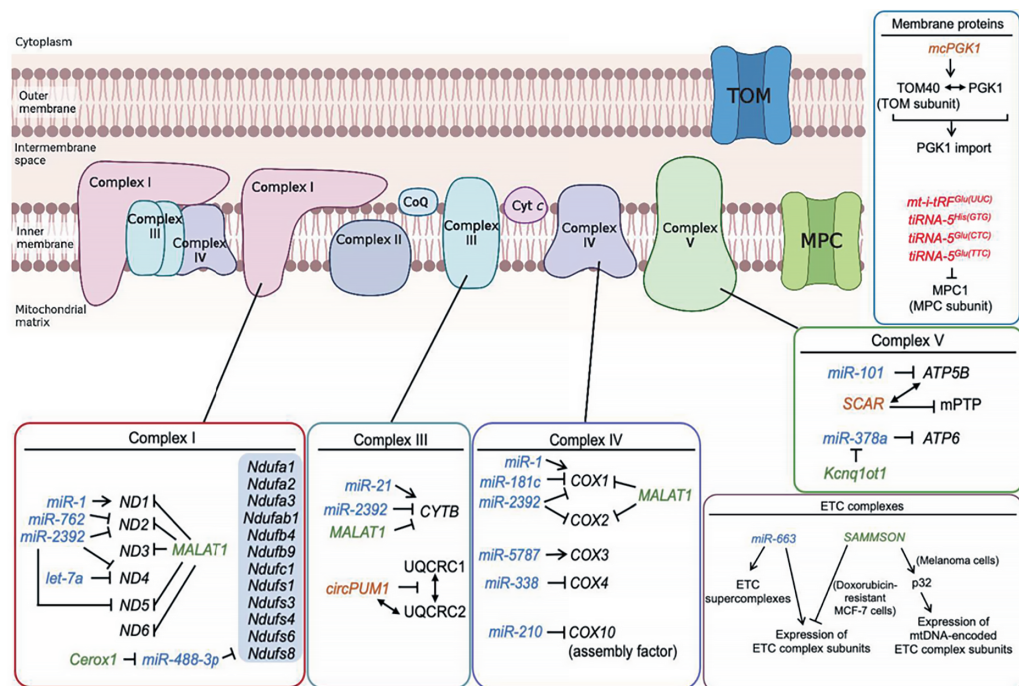


図 1. 非コード RNA によるミトコンドリア電子伝達系・酸化的リン酸化の制御

Fig.1. Regulation of mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation by non-coding RNAs. (Kobayashi A, et al. (2023): Int J Mol, 24 (11), 9414.)

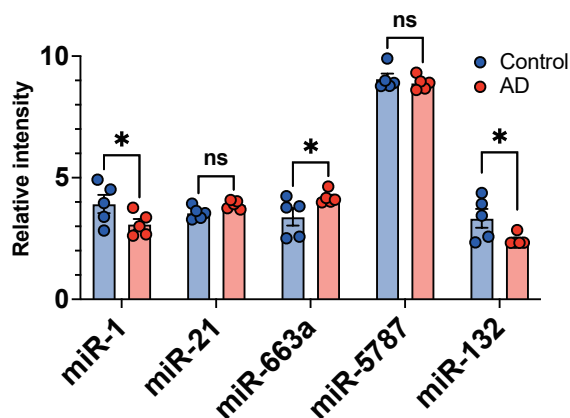


図2. 運動により変動しミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御にかかわる miRNA(miR-1, miR-21, miR-663a, miR-5787)のコントロール群と AD 患者群の前頭皮質における発現レベルの比較

Fig.2. The expression levels of miRNAs involved in exercise-induced fluctuations and regulation of mitochondrial respiratory chain complexes(miR-1, miR-21, miR-663a, miR-5787) in Alzheimer's disease(AD) patient prefrontal cortex.

Control subjects (n = 5) are in blue and AD patients (n = 5) are in red. Unpaired two-tailed Student's t-test was performed. All graphs show mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$, ns = not significant.

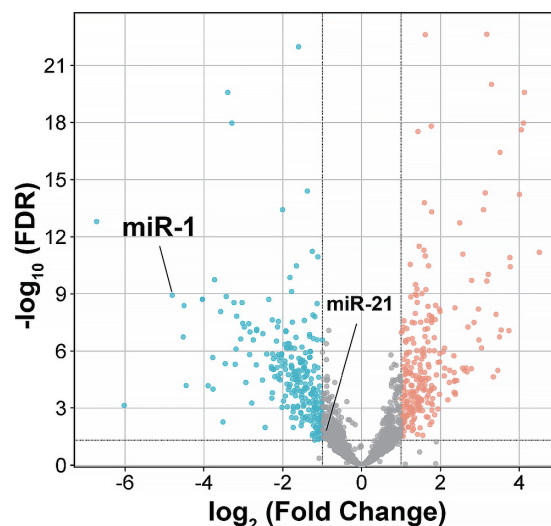


図3. Small-seq のコントロール群と FTD 患者群の前頭葉における発現レベルの比較

Fig.3. Reanalysis of published small-RNA-seq data on FTD frontal cortex compared with control.

Volcano plots of frontal cortex small RNA-seq comparing FTD (n = 13) and control subjects (n = 12) with significantly downregulated and upregulated small RNAs in blue and red, respectively. Differential expression was evaluated using the DESeq2 Wald test with FDR adjustment. Dataset E-MTAB-12731, batch 1 reanalyzed.

miRNA のうち、タウを主病変とする異なる認知症患者の脳組織において一貫して miR-1 の発現レベルが有意に低下していた (図2, 3)。

C. miRNA mimic の細胞内導入によるミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成制御の評価

上記の miRNA のシーケンスを用いて人工的に合成した miRNA mimic を神経細胞内に導入し、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成に影響を及ぼすかを評価した。ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成の制御を検出する目的で以前に確立した FRET 現象を活用したライブイメージングによる FRET シグナルの定量手法⁴⁾を用いた。ミトコンドリア呼吸鎖超複合体が形成されると、cGFP タグ付き複合体 I の励起により、DsRed-Monomer タグ付き複合体 IV からの発光信号が得られる仕組みになっている (図4 a)。

miR-1、miR-21、miR-663a、miR-5787の人工的に合成した miRNA mimics を細胞内導入した神経細胞における FRET シグナルの定量を行ったところ、miR-1 mimics を細胞内導入した神経細胞においては、濃度に相関して FRET シグナルの増加がみられた (図4 b)。また、40 nM の miR-1 mimics

を細胞内導入した群では、陽性コントロールに近い FRET シグナル値が計測され、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成促進が示唆された。

ヒト iPS 由来神経細胞で AD、FTD といったタウを主病変とする認知症のモデルの Tau P301S 変異細胞に対して miR-1 mimics を細胞内導入し、神経細胞の形態変化・経時的な動態解析をしたところ、神経突起の長さや分岐部位の数量が miR-1 mimics を細胞内導入した群で有意に増加した (図4 c)。また、Tau P301S 変異細胞の生存率の変化についても計測したところ、miR-1 mimics を細胞内導入した群で有意に上昇した (図4 d)。

考 察

当初の研究計画では、上記の *in vitro* 実験と並行して、AD モデルマウスを用いた運動介入研究を実施する予定であった。具体的には、AD モデルマウスにトレッドミルによる走行試験を数週間にわたり継続的に実施し、運動前後における脳内ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を制御する miRNA 発現量の変化、ミトコンドリア機能および ATP 産生能の変化、ならびに神経保護作用の

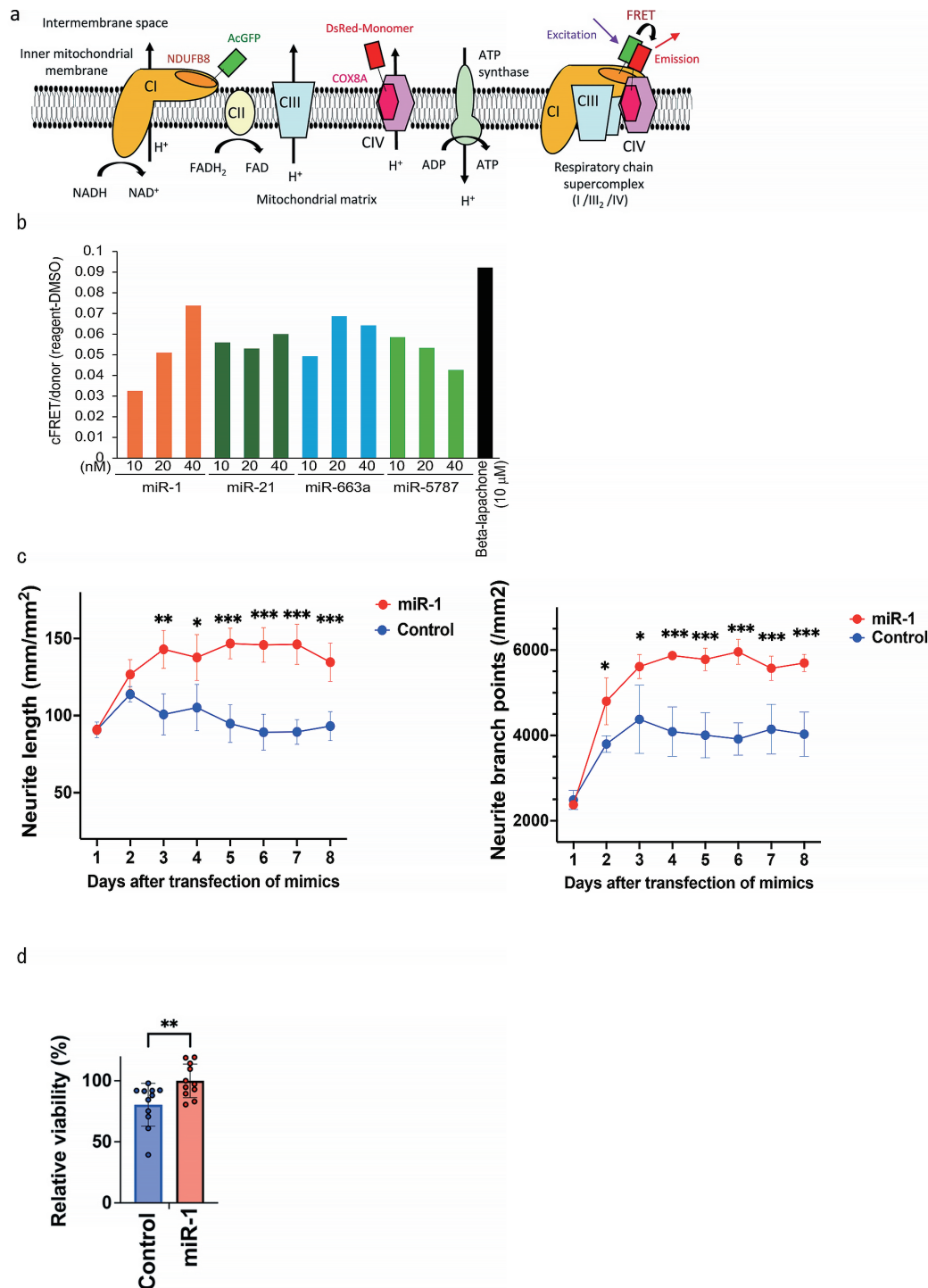


図4. 運動により変動しミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御にかかわる miRNA による細胞内ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成の制御と神経細胞の形態変化

Fig.4. Regulation of intracellular mitochondrial respiratory chain complex formation by miRNAs involved in the control of mitochondrial respiratory chain complexes, which fluctuate with exercise.

(a) Intermolecular FRET biosensors of mitochondrial respiratory chain complex detect supercomplex formation in cells⁴). (b) cFRET/donor signals detected in miRNA mimics (miR-1, miR-21, miR-663a, miR-5787) transfected cells with various concentrations (10, 20, 40 nM). (c) Tau P301S human neurons transfected with miR-1 mimics were monitored for neurite length and neurite branch points over 8 days by live-cell imaging (n = 3 biological replicates/group). (d) Neuronal viability was assessed by Alamar Blue assay 8 days after transfection (n = 11 biological replicates/group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

評価を経時的にモニタリングすることで、miRNAを介した運動による認知症予防効果を *in vivo* レベルで検証することを目的としていた。また、認知症モデルマウスへの miRNA mimics/阻害薬の脳内投与による脳組織の病理学的改善および認知症症状の改善効果についても、本研究期間内に評価する予定であった。

しかしながら、研究助成期間中にトランプ政権下の新規政策によりハーバード大学に対する研究費制限が発生し、マウスのオーダーリングが一定期間凍結したため、上記の動物実験を予定どおりに実施することができなかった。このため、本助成期間内の研究はヒト死後脳検体を用いた miRNA 解析およびヒト iPSC 由来神経細胞を用いた *in vitro* 実験を新規に進めることとなった。マウスを用いた運動介入研究については、今後の研究課題として引き続き取り組む予定である。

本研究では、運動により発現が上昇すると報告されており、AD および FTD の認知症患者の脳組織内で低下している miR-1 がミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成制御に関与する可能性について検討した。その結果、miR-1 mimic を細胞内に導入した神経細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成が促進されることが示された。これまでに、運動により脳内の miR-1 が増加することが報告されており、本研究の結果と合わせて、運動による miR-1 の上昇が神経細胞内のミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を促進する可能性が示唆された。また、認知症モデルのヒト iPSC 由来神経細胞において、miR-1 の上昇が神経細胞の形態的变化を引き起こし、神経保護作用を示すことが明らかとなった。しかしながら、miR-1 の増加が神経細胞内のミトコンドリア機能および ATP 産生能の向上に寄与するか、また miR-1 を脳内投与した認知症モデルマウスにおいて脳組織の病理学的改善や認知症症状の改善がみられるかどうかについては、今後の検証が必要である。また、miR-1 をターゲットにした運動による認知症予防効果を示すためには、高齢マウスにおける脳内 miR-1 の測定、トレッドミルによる走行試験を実施し、運動前後の miR-1 の変化、ミトコンドリア機能および ATP 産生能の変化、ならびに認知症

症状の有無を経時的にモニタリングする研究が必要である。更に、miR-1 の上昇に伴うミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成促進が、呼吸鎖複合体 I の形成または機能の促進によるものなのか、それとも各呼吸鎖複合体の発現量に変化がなく、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成のみが促進されるのかを検証する必要がある。この点については、現在、miR-1 mimic を細胞内に導入した神経細胞からミトコンドリアを抽出し、BN-PAGE を用いて各呼吸鎖複合体の発現量を確認するとともに、miR-1 mimic 導入によるミトコンドリア機能および ATP 産生能の変化を検討している

総 括

本研究では、運動による認知症発症予防効果のメカニズムとして、miR-1 がミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成促進に寄与する可能性を明らかにした。これらの知見は、運動による認知症発症予防効果をミトコンドリアの機能制御という新たな視点から解明するための基盤となる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団の助成を受けて行われました。また、本研究の遂行に協力いただいた東京都健康長寿医療センター研究所老化機構部門システム加齢医学井上聡先生、竹岩俊彦先生に心より感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Bosetti F, et al. (2002): Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **23**(3), 371-376.
- 2) Calvani R, et al. (2013): Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem*, **394**(3), 393-414.
- 3) García-Mesa Y, et al. (2012): Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging*, **33**(6), 1124.e13-1124.e29.
- 4) Kobayashi A, et al. (2023): A FRET-based respirasome assembly screen identifies spleen tyrosine kinase as a target to improve muscle mitochondrial respiration and exercise performance in mice. *Nat Commun*, **14**(1), 312.
- 5) Marques-Aleixo I, et al. (2015): Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto

- (mito)phagy markers. *Neuroscience*, **301**, 480-495.
- 6) Maurer I, et al. (2000): A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*, **21**(3), 455-462.
 - 7) Navarro A, et al. (2004): Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**(5), R1244-R1249.
 - 8) Zhang J, et al. (2025): Effect of exercise on regulating miRNA expression in brain health and diseases. *Biology (Basel)*, **14**(6), 729.
 - 9) Zhao N, et al. (2023): Treadmill exercise improves PINK1/Parkin-mediated mitophagy activity against Alzheimer's disease pathologies by upregulated SIRT1-FOXO1/3 axis in APP/PS1 mice. *Mol Neurobiol*, **60**(1), 277-291.