

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14649

研究課題名(和文)アルツハイマー病脳病巣に関連するmiRNAエディティングの証明

研究課題名(英文)Identification of microRNA editing related to the brains with Alzheimer's disease

研究代表者

桑野 良三 (Kuwano, Ryoza)

新潟大学・脳研究所・フェロー

研究者番号：20111734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)脳におけるエピジェネティクス効果に注目して、マイクロRNA(miRNA)を介する遺伝子発現機構を解析した。miR-501\_3P miRNAが、ADの脳病巣進展に関連して増加することを見出した。神経系培養細胞SH-SY5YにmiR-501\_3Pを導入し過剰発現させると、208遺伝子の発現が有意に変化し、その内128遺伝子が減少していた。mRNAと相補的な結合に重要な塩基配列の2番目～8番目のseed配列に変異を入れ、SH-SY5Yにトランスフェクションすると、miR-501\_3PのターゲットmRNAの発現に明らかな変化が生じていた。

研究成果の概要(英文)：To determine the epigenetic effects on the progression on Alzheimer's disease (AD), the gene expression through microRNA in the brain was analyzed. All autopsied brains are systematically diagnosed with Braak staging based on the density of amyloid deposition and neurofibrillary tangles in the brain. The temporal cortex tissues were carefully dissected and stored at -80 °C until use. The expression of miR-501\_3P was remarkably upregulated in the AD brains related to the pathological progression.

The overexpression of miR-501-3p in the neuroblastoma derived cultured cells (SH-SY5Y), which mimicked the miR-501-3p upregulation in the AD brains, resulted in the significant changes in the expression levels of 208 genes in which 128 genes were downregulated. Mutation in the seed sequence at the position 2 to 8 nucleotide of the miR-501\_3P induced the significant alternative expression of the target mRNA in the SH-SY5Y cells.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：マイクロRNA アルツハイマー病 ヒト脳組織 神経系培養細胞 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会に突入し、高齢者の「健康寿命をのばす」取り組みは喫緊の課題となっている。なかでも認知症は、世界規模では3秒に一人が発症し、本人のみならず家族、介護者、医療経済にとっても重大な問題である。認知症の大多数を占める孤発性アルツハイマー病(AD)は、70歳を超えて罹病率が急増する晩期発症型の神経変性疾患である。原因遺伝子変異による家族性若年発症でも40~50歳までは無症候である。ADの神経病理学的2大特徴である脳内アミロイド蓄積(SP)や神経原線維変化(NFT)は40歳以前には観察されない。

(2) ADの最大のリスクは加齢と考えられるが、高齢者全員がADを発症しない。なりやすい家系となりにくい家系が存在するので、家族歴は一つの発症因子と考えられ、発症者と未発症者の全ゲノム関連解析が行われた。多くのリスク遺伝子が同定されたが、APOE遺伝子に相当する強いリスク遺伝子は見つっていない。個人ゲノム情報は大きな発症要因であるので、ゲノムをベースとした遺伝子発現の調節機構並びに複数遺伝子間の相互作用解析が重要分野となってきた。

## 2. 研究の目的

(1) 研究の位置付け：普通に機能していた脳が、ある時点から段階的かつ不可逆的に喪失することから、~両親から受け継いだ体細胞ゲノム配列情報は一生不変であるので、脳ゲノムをベースとした遺伝子発現が生体内外の環境変動を受けて発症すると考えられる。脳の部位別に機能分化した多種多彩の神経細胞が脱落・変性する機構として、脳内発現タンパクの種類と量的変動、タンパク-タンパク相互作用が発症とAD病勢の進行を左右すると推測できる。したがって、ゲノム情報だけでなく、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を解明することに着眼した。

(2) 脳mRNA変動：AD病理は、神経細胞自体の機能不全と神経ネットワークの破綻が不可逆的に進行する神経変性疾患である。さらに、病巣の進展は、無秩序には起こらず一定の方向に脳内SPとそれに続くNFT病変が拡散していくので、この2大病理変化の程度を指標(Braakステージ分類)として、病勢が評価できる。剖検時にBraakステージ分類された脳部位(嗅内皮質、側頭葉、前頭葉)の遺伝子発現の変化を全Exon array法でmRNAを網羅的に測定した。その結果、脳部位と病勢の進行に伴って、8種類のmRNAを同定した(Miyashita A. *et al*, 2014, Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*, 4巻, e396)。これらのmRNA発現と翻訳制御の解明は、AD病態を理解するために、意義がある

と考え、解析を進める方針を立てた。

(3) mRNA発現制御：多くの病気は個人ゲノムの表現型と捉えることができる。表現型である病態の基本は、ゲノムにコードされたタンパクの構造変化に加えて、連続する生理活性の代謝の乱れと考える。病態を担うタンパクの発現変動について、本研究では転写後のmRNAの安定性および翻訳効率に注目し、タンパク高次構造(アミノ酸一次配列)に直接変化をもたらさないノンコーディングRNAの機能解析を行う。これまでに、イントロンや遺伝子間に存在するノンコーディングRNAによるエピジェネティクス制御が見つかった。

(4) 意義：ノンコーディングRNAによるエピジェネティクス機構は、特に細胞分裂を停止した神経細胞では大きな意義がある。成熟した神経細胞のような非分裂細胞では、遺伝子組み換えを引き起こすことが難しい。分化した神経細胞には相同組換え修復の仕組みがない。したがって、分裂中にゲノムの再構築による多彩な機能を獲得するのではなく、転写後にmRNA分解や翻訳効率に関わる機構は重要な視点であり、それを担う分子の同定は本質的課題である。

(5) 目的：多くの病気についてノンコーディングRNAを介するエピジェネティクスの解析行われてきたが、ADに関しては、脳組織を直接研究の対象とするため、従来のゲノム解析を補完するノンコーディングRNAの系統だった解析はなかった。

本研究では、1) AD発症前、発症、発症後の病勢をモニターできる臨床診断価値の高い血清マイクロRNA(miRNA)の同定、2) 血清で見出されたmiRNAを神経病理学的に診断された脳組織で確認、3) 神経系培養細胞におけるmiRNAの機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 研究対象として剖検時に脳半球が病理診断されたヒト凍結脳(共同研究者から提供)を用いる。AD病理を特徴づける2大病変であるSP(0, A, B, Cの4段階)とNFT(0, I, II, III, IV, V, VIの7段階)の程度によって正常、軽度AD、重度ADに分類する。本研究では、正常脳(SP=0, A; NFT=0~II)、AD脳(SP=C; NFT=IV~VI)と定義し、正常脳(18例)、AD脳(27例)を解析する。解析精度を上げるため、SP=BおよびNFT=IIIの症例はAD病変の移行時期と考えて用いない。

(2) 凍結正常脳およびAD脳からmiRNeasy Serum/Plasma Kit(QIAGEN)を用いて、トータルRNAを抽出する。次世代シーケンサー(Genome Analyzer IIX:GAIIx)用に、TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit

を用いてサンプル調製し、アクリルアミド電気泳動によって低分子cDNAを分画・分取する。

(3) GAllx用にIndex標識されたサンプルをシーケンサーにかけて、各サンプルにつき2000万以上のシングルリード情報を網羅的に取得する。生データはFASTQ形式およびBAMファイルに変換して、データ用サーバーに保存する。

(4) 低発現(リード数50以下)は誤差を生じるために解析に用いない。False Discovery Rate (FDR) の多重検定補正した後、正常脳とAD脳におけるmiRNA発現量に差があるかを統計学的に検定する。有意差のあるmiRNAについて病期進行(Braak stage 評価)との関連性を確認する。

(5) miRNAはmRNAに結合してmRNAの安定性や翻訳抑制をしていると考えられている。miRBaseやTargetScan等の公開データベースを参考に、上記のmiRNAがターゲットにするmRNAとADとの関連を調べる。

(6) miRNAの機能を調べるために、ヒト神経細胞由来の培養細胞(SH-SY5Y)にmiRNAを導入し過剰発現させて、miRNAのターゲットmRNA発現量の変動を確認する。

(7) miRNAは複数のmRNAと部分相補的に結合してmRNAの安定性と遺伝子発現制御に関わっている。mRNAの相補的な結合に重要なseed配列(miRNA塩基配列の2番目~8番目)に変異を入れる。野生型と変異型のmiRNAをSH-SY5Yに導入してmRNA発現の変化を観察する。

#### 4. 研究成果

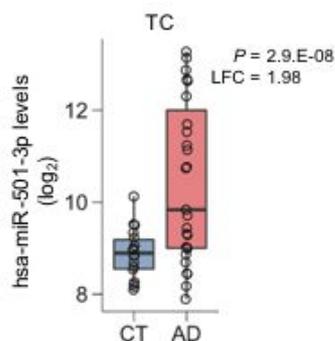
(1) 血清miRNA変動: mRNA発現変動を制御する分子として、ノンコーディングRNAのエピジェネティクス効果に注目した。AD発症と進行をモニターするために、血清中の全低分子RNA(miRNA)を網羅的に解析した。各miRNAの発現変動量は次世代シーケンサーによるリード数で評価した。ADの血清miRNAを対照群と比較したところ、miR-501-3pは有意に低下し、let-7f-5pとmiR-26b-5は有意に増加していることを見出した。

(2) 上記3種類のmiRNAの再現性の確認: 臨床診断されたAD(36例)と年齢を揃えた健康者(22例)の血清を用いて、RT-PCR法によるmiRNA定量を行った。その結果、let-7f-5pとmiR-26b-5は有意差が見られなかったが、miR-501-3pは有意( $P=0.00002$ )に減少し、fold changeは0.54であった。

(3) AD脳におけるmiR-501-3pの発現量: ADと対照群(CT)の側頭葉(TC)から低分子

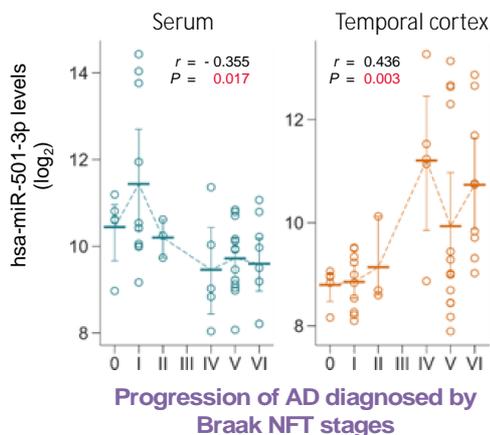
RNAを抽出し、同様に次世代シーケンサーを用いて解析した。リード数50以上の発現量のある472 miRNAについて解析した結果、CT脳と比較して187 miRNAがAD脳で有意( $P<0.05$ )に変化していた。そのなかで、AD血清で見つかったmiR-501\_3Pが有意に増加していることが解った(図1)。

図1 側頭葉におけるmiR-501\_3Pの発現比較



(4) miR-501\_3PとADの進行: AD病期の進行をBraak Stageで評価し、各段階における血清と側頭葉のmiR-501\_3Pを測定した。その結果、ADの血清中miR-501\_3Pは減少し、脳では逆に増加することを見出した(図2)。

図2 AD病勢とmiR-501\_3Pの発現



(5) 神経系由来の培養細胞における検討: miR-501\_3PをSH-SY5Yにトランスフェクションし、12,688遺伝子を解析したところ、208遺伝子が有意に変化していることがわかった。その内128遺伝子は減少していた。

(6) miR-501\_3Pのseed配列に変異を入れると部分相補的結合が不完全となり、変異を入れない野生型の発現パターン(5)と異なる遺伝子群の発現が観察された。このトランスフェクション実験によって、miR-501\_3Pは特定のmRNAと部分相補的に結合して、mRNAの安定性と遺伝子発現制御に影響を与えると思われた。これらの研究成果によって、AD発症と病期進展の研究に、miRNAを介したエピジェネティクス機構が、新しい有効なアプローチとなる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Iwatsubo T, Iwata A, Suzuki K, Ihara R, Arai H, Ishii K, Senda M, Ito K, Ikeuchi T, Kuwano R, Matsuda H; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Sun CK, Beckett LA, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Donohue MC; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Japanese and North American Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative studies: Harmonization for international trials. *Alzheimers Dement.* 査読有, 2018, pii: S1552-5260(18)30102-X. doi: 10.1016/j.jalz.2018.03.009.

Sakai A, Nakato R, Ling Y, Hou X, Hara N, Iijima T, Yanagawa Y, Kuwano R, Okuda S, Shirahige K, Sugiyama S. Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front Neurosci.* 査読有, 2017, 11 巻, 307. doi: 10.3389/fnins.2017.00307.

Jun GR, 他 (51 人中 28 番目) Transethnic genome-wide scan identifies novel Alzheimer's disease loci. *Alzheimers Dement.* 査読有, 2017, 13 巻, 727-738. doi: 10.1016/j.jalz.2016.12.012.

Hara N, Kikuchi M, Miyashita A, Hatsuta H, Saito Y, Kasuga K, Murayama S, Ikeuchi T, Kuwano R. Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 査読有, 2017, 5 巻, 10. doi: 10.1186/s40478-017-0414-z.

Fujishima M, Kawaguchi A, Maikusa N, Kuwano R, Iwatsubo T, Matsuda H; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI); Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (J-ADNI). Sample Size Estimation for Alzheimer's Disease Trials from Japanese ADNI Serial Magnetic Resonance Imaging. *J Alzheimers Dis.* 査読有, 2017, 56 巻, 75-88. doi:10.3233/JAD-160621.

Kikuchi M, Ogishima S, Mizuno S, Miyashita A, Kuwano R, Nakaya J, Tanaka H. Network-Based Analysis for Uncovering Mechanisms Underlying Alzheimer's Disease. *Methods Mol Biol.* 査読有, 2016, 1303 巻, 479-491. doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5\_25.

Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H, Nakaya J. AlzPathway, an Updated Map of Curated Signaling Pathways: Towards Deciphering Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 査読有, 2016, 1303 巻, 423-432. doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5\_25.

Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Tatsumi S, Mimuro M, Kuwano R, Hasegawa M, Yoshida M. An autopsied case of unclassifiable sporadic four-repeat tauopathy presenting with parkinsonism and speech disturbances. *Neuropathology.* 査読有, 2016, 36 巻, 295-304. doi: 10.1111/neup.12274.

[学会発表](計 5 件)

桑野良三、遺伝子レベルから見た高齢期ダウン症者の特徴と治療に向けて. 第1回成人期ダウン症研究会, 2017年11月11日、大正大学(東京都)

桑野良三、ダウン症とアルツハイマー病に共通する問題. 2017年8月12日、群馬県社会福祉総合センター(群馬県・高崎市)

Hara N, Kikuchi M, Miyashita A, Hatsuta H, Saito Y, Kasuga K, Murayama S, Ikeuchi T, Kuwano R. Identification of serum microRNA as a potential biomarker related the progression of Alzheimer's disease. AAIC (Alzheimer's Association International Conference) 2017年7月18日 ExCeL London (イギリス・ロンドン)

桑野良三、ダウン症者早期アルツハイマー病の治療法を考える. 第59回日本小児神経科学会, 2017年6月16日-4日, 神戸国際展示場、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

桑野良三、認知症の遺伝学的研究 update. 第35回日本認知症学会, 2016年12月2日、東京国際フォーラム、(東京都)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

アウトリーチ活動

桑野良三、知的障害者の認知症について  
(ダウン症を中心に)、平成29年度岡山  
県知的障害者福祉協会職員研究会、2018  
年1月17日、岡山県総合福祉・ボランテ  
ィア・NPO会館、(岡山県・岡山市)

桑野良三、認知症のメカニズムと知的障  
害者にとっての認知症、平成29年度認  
知症セミナー、2017年10月5日、千葉  
市ポートプラザ千葉(千葉県・千葉市)

桑野良三、認知症遺伝子研究の歴史と課  
題、認知症センターセミナー、2017年6  
月9日、国立長寿医療センター(愛知県・  
大府市)

桑野良三、アルツハイマー病を理解して  
予防を考える、市民参加型ミニシンポジ  
ウム、2017年2月9日、富山国際会議場  
(富山県・富山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 良三 (KUWANO, Ryozo)  
新潟大学・脳研究所・フェロー  
研究者番号：20111734

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )