

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07099
研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト変性過程に関与するマイクロRNAの解析

研究課題名(英文)Analysis of microRNA in oligodendrocyte degeneration

研究代表者

久原 真 (Hisahara, Shin)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80336403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴデンドロサイト(OLG)前駆細胞を取り出す手順については概ね確立したが、有意差のあるmiRNAの発現の比較が困難であった。そこで計画を変更し初代培養や細胞株を用いて、SIRT1ならびにSIRT2をノックダウンすると前駆細胞からの分化が明らかに促進することがわかった。SIRTファミリーによって変化するOLG特異的な細胞骨格タンパク質 IV-tubulinとTubulin polymerization promoting protein (TPPP)の発現がSIRT1とSIRT2のノックダウンにより発現が上昇した。SIRT1にはSIRT2とほぼ同等の成熟OLGへの分化抑制効果が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSは本邦でも罹患率が上昇の一途をたどる神経難病の一つである。これまでのMS研究は免疫細胞による炎症性中枢神経障害の機序を解明するものがほとんどであり、現在のところ副腎皮質ホルモンや疾患調整薬などで炎症反応を抑制し臨床的再発を減少させても脳萎縮や認知機能を含めた長期的な機能予後の悪化を制御することは困難であることが次第に明らかにされている。本研究はMSの発症機序において免疫異常・炎症とは独立したOLGの一次的変性過程によって障害される何らかの分子メカニズムが存在すると仮定し、そのメカニズムにmiRNAが関与していると考えることが発端になっており、以下の特色と意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We successfully established collect oligodendrocyte premature cells (OPC) in the primary culture from mouse embryonic brain, however, it was difficult to identify significant miRNA derived from differentiating OPCs. So we modified our strategy, showing the function of SIRT1 and SIRT2 in the OPC differentiation. Knockdown of not only SIRT1 but also SIRT2 promoted increasing number of well-differentiated OLGs. The mature OLGs show broadly cellular distribution of OLG-specific cytoskeleton-related molecules, IV-tubulin and tubulin polymerization promoting protein (TPPP). Although IV-tubulin and TPPP are not directly associated with SIRT1/SIRT2, we demonstrated that knockdown of SIRT1 and SIRT2 independently give rise to induction of these molecules. Our findings indicate that SIRT1 and SIRT2 inhibitory regulate OLG differentiation, at least from OLG progenitor cells, through the suppression of expression of OLG-specific cytoskeleton-related molecules and their subcellular distribution.

研究分野：神経内科学

キーワード：オリゴデンドロサイト 変性 マイクロRNA 初代培養 多発性硬化症 SIRTファミリー 分化 前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイト(OLG)はミエリンタンパク質を産生し、軸索を髄鞘化しているが、多発性硬化症(MS)ではOLGが障害され脱髄が生じる。これまでのMSは中枢神経に末梢からのリンパ球などの細胞障害性免疫細胞が浸潤し炎症反応が生じるOLGが傷害されると考えられてきた。しかし近年の長期疫学調査、画像所見の知見の集積からMSは免疫炎症反応をコントロールされた状態であっても身体機能の低下、脳萎縮が緩徐に進行することが明らかになり、OLGが直接障害される変性疾患の要素があることが示唆されている(Hauser et al., *Neuron*, 2006)(図1)。殊に脳萎縮はMSの病期としてかなり早期から出現している可能性も示唆されている(De Stefano et al., *Neurology*, 2010)(図2)。脱髄巢の病理所見を観察すると炎症所見が見られない箇所では細胞死を免れているOLGやOLGの前駆細胞などの存在が認められるものの、再髄鞘化は不十分な状態で観察されておりこれらが二次的な軸索障害や脳萎縮に進展していく可能性が示唆されている。

一方近年同定されたmiRNAは内在性に細胞内に存在する短いRNA配列であり特定のmRNAに対して相補的に結合しその分解や切断を行うことで翻訳抑制をきたすことが知られている。miRNAは細胞ストレスから恒常性を維持するために一次的に発現が増減するだけでなく例えばアルツハイマー病においてmiR-29がセクレターゼの活性を低下させるなど様々な神経変性疾患の病態にも関与し、種類によっては病態を悪化させる方に作用することもあるとされる(Basak et al., *Cell Mol Life Sci*, 2016)。

これまでMSや脱髄疾患で発現が変化するmiRNAの研究が報告されているが、主に炎症性サイトカイン産生免疫細胞の増殖や機能の制御に関して焦点を当てている。またOLGの分化制御に関与するmiRNAに関する研究は非常に報告の数が限られ、病的な状態において細胞自律的に変動するものを明らかにした報告はほとんどない。

以上の知見から、

1. 脱髄疾患MSでは皮質・白質のOLGは炎症反応の強弱の如何によらず、何らかの変性機序により障害され脱髄が生じ、再髄鞘化が阻害されている可能性がある。
2. その際、OLGにおいて細胞自律的ないし非自律的にmiRNAの発現が持続的に変化し恒常性に対して破壊的あるいは保護的に作用する可能性がある。
3. OLG細胞保護、再髄鞘化促進に関与するmiRNAを明らかにすることでMSの新たな治療戦略を構築しうる可能性がある。

と着想した。

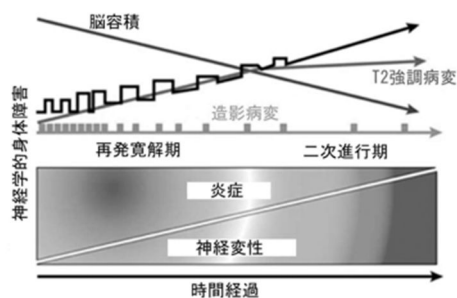


図1. MSは時間経過で炎症所見に乏しくても脳容積減少身体障害が緩徐に進行する

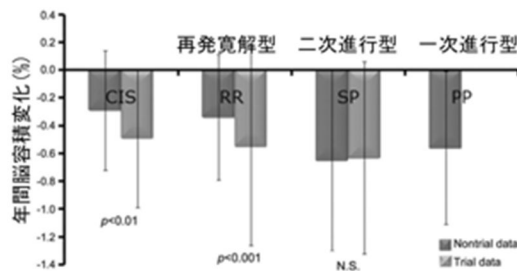


図2. MSでは再寛解を繰り返す状態になる前(図中CIS)から脳萎縮が明らかになっている

2. 研究の目的

細胞機能を恒常的に維持するために様々な分子の発現を制御する内在的マイクロRNA(miRNA)が近年同定されている。これらは細胞に負荷されるストレスに対して一時的に発現が変化するだけではなくさまざまな神経変性疾患において長期間にわたり作用することも明らかになっている。中枢神経脱髄疾患であるMSは免疫異常により中枢神経に炎症が生じることが病態の中心と考えられてきたが、近年髄鞘ミエリン産生細胞であるOLGを障害する変性疾患の特徴を有することも次第に明らかになってきている。本研究はMSの病態機序を変性疾

患と捉えその病態に關与する OLG において変化しうる miRNA の同定並びにその機能を *in vitro* ないし *in vivo* の系で明らかにし治療戦略に供することを目的とする。

3. 研究の方法

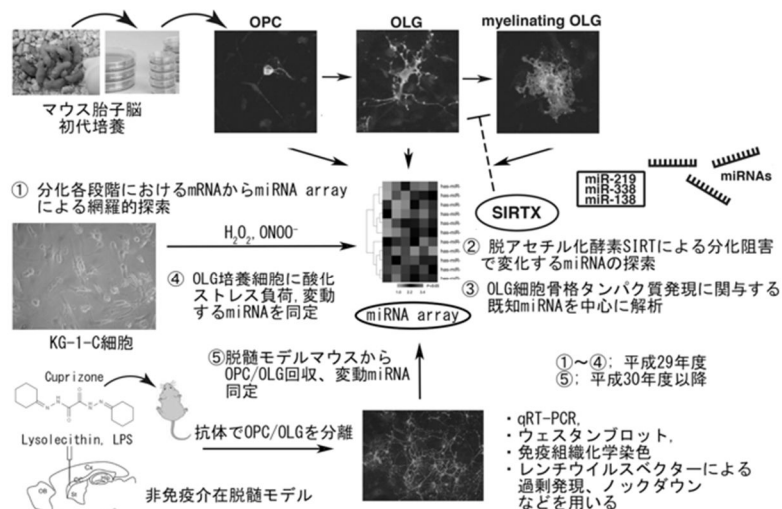
1. OLG 分化を制御しうる miRNA の同定

申請者が現在用いている、マウス初代培養による OLG 前駆細胞(OPC)から OLG 細胞へ分化させる系を用いる。分化前の OPC, 分化条件で培養中の OPC, 成熟した OLG を回収して total RNA を取り出して miRNA array 解析でコントロール条件の結果と比較することで網羅的に発現が上昇ないし低下した miRNA 候補を探索する。Array 解析やデータマイニングは商業機関に依頼する。各過程で発現が変動する miRNA が分化を制御しうる miRNA と考えられる。候補 miRNA を同定できれば、電気穿孔法を利用した[®]Nucleofection 法、レンチウイルスベクターカセットなどを用いて、細胞に miRNA を過剰発現させる。miRNA の機能によっては mismatches morpholino 配列を人工的に作成して細胞内に導入してその発現をノックダウンさせることも考慮する。パイオメーカーから RISC-miRNA 複合体に対して特異的に結合する RNA を発現するプラスミドが製品化されておりこれを利用することも考えられる。これら発現制御によって OPC の分化の効率を免疫細胞染色やウェスタンブロットで A2B5, O4, O1 などの未分化細胞マーカー、CNPase, MBP などの成熟細胞マーカーの発現の変化を観察する。

この研究が計画通り進まない際には次の検討を行う。申請者はすでにタンパク質脱アセチル化酵素 SIRT ファミリー分子を発現抑制することで OPC の成熟 OLG への分化効率が促進していることを見出しており、その際に OLG 特異的細胞骨格分子の細胞内分布が変化していることを見出している。SIRT が関与した分化の過程、殊に髄鞘化に重要な細胞突起の伸長に關与している miRNA の同定のため、[®]Nucleofection 法で SIRT 分子をノックダウンした OLG とコントロールの細胞から RNA を回収して miRNA array で変化する miRNA 候補を同定する。また、OLG の分化に關与する既知の miRNA(miR-219, 338, 138 など)が SIRT 分子ノックダウンで発現が変化するかを検討する。殊に tubulin 關連分子などの細胞骨格タンパク質の発現や細胞内局在に關与しうるかを検討する。

2. 酸化ストレス負荷にて変動する OLG における miRNA の同定

動物モデルとの整合性を期して、TNF- α などの炎症性サイトカインによらない OLG への細胞傷害負荷を与えた場合に变化する miRNA を同定する。MS 患者脳における OLG の変性を解析した報告では酸化ストレスの關与が示唆されている(Haider et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014)。OLG 細胞株 KG-1-C 細胞に対して過酸化水素水(H₂O₂)ないし ONOO⁻を添加する。免疫染色や MTT assay, LDH assay によって viability が低下することを確認して、上記と同じように RNA を回収し miRNA array にてコントロールと比較して変動する miRNA を同定する。ここで同定された miRNA を上記の方法で過剰発現ないしノックダウンすることで、細胞の形態や viability を検討する。



研究計画概要

4 . 研究成果

細胞機能を恒常的に維持するために様々な分子の発現を制御する内在的 miRNA が近年同定されている。我々が関心を持つ中枢神経脱髄疾患である MS は免疫異常により中枢神経に炎症が生じることが病態の中心と考えられてきたが、近年髄鞘ミエリン産生細胞である OLG を障害する変性疾患の特徴を有することも次第に明らかになってきている。そこで MS の病態機序を変性疾患と捉えその病態に関与する OLG において変化しうる miRNA の同定並びにその機能を in vitro ないし in vivo の系で明らかにし治療戦略に供することを目的として申請したものである。このためにマウス初代培養による OPC から OLG 細胞へ分化させる系を用いる。分化前の OPC, 分化条件で培養中の OPC, 成熟した OLG を回収して total RNA を取り出して miRNA array 解析でコントロール条件の結果と比較することで網羅的に発現が上昇ないし低下した miRNA 候補を探索することを計画していた。

マウス胎仔脳から OLG 前駆細胞を取り出す手順については概ね確立したが、有意差のある miRNA の発現の比較が困難であった。そこで計画を変更し初代培養や細胞株を用いて、SIRT1 ならびに SIRT2 をノックダウンすると前駆細胞からの分化が明らかに促進することがわかった。SIRT ファミリーによって変化する OLG 特異的な細胞骨格タンパク質 IV-tubulin と Tubulin polymerization promoting protein (TPPP) の発現が SIRT1 と SIRT2 のノックダウンによって発現が上昇した。SIRT2 は OLG の分化を抑制されることが示唆されているが、SIRT1 にもほぼ同等の分化抑制効果があることが明らかにすることができた。現在論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki Yusei, Niino Masaaki, Takahashi Eri, Suzuki Masako, Mizuno Masanori, Hisahara Shin, Fukazawa Toshiyuki, Amino Itaru, Nakano Fumihito, Nakamura Masakazu, Akimoto Sachiko, Minami Naoya, Fujiki Naoto, Doi Shizuki, Shimohama Shun, Terayama Yasuo, Kikuchi Seiji	4. 巻 187
2. 論文標題 Fingolimod induces BAFF and expands circulating transitional B cells without activating memory B cells and plasma cells in multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2017.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Yokokawa Kazuki, Saito Taro, Fujikura Mai, Iwahara Naotoshi, Matsushita Takashi, Suzuki Syuuichirou, Hisahara Shin, Kawamata Jun, Suzuki Hiromi, Emoto Miho C., Fujii Hirotada G., Shimohama Shun	4. 巻 67
2. 論文標題 Evaluation of Mitochondrial Oxidative Stress in the Brain of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease by in vitro Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-180985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujikura Mai, Iwahara Naotoshi, Hisahara Shin, Kawamata Jun, Matsumura Akihiro, Yokokawa Kazuki, Saito Taro, Manabe Tatsuo, Matsushita Takashi, Suzuki Syuuichirou, Shimohama Shun	4. 巻 68
2. 論文標題 CD14 and Toll-Like Receptor 4 Promote Fibrillar A β Uptake by Microglia Through A Clathrin-Mediated Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 323 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-180904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokokawa Kazuki, Iwahara Naotoshi, Hisahara Shin, Emoto Miho C., Saito Taro, Suzuki Hiromi, Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Matsushita Takashi, Suzuki Syuuichirou, Kawamata Jun, Sato-Akaba Hideo, Fujii Hirotada G., Shimohama Shun	4. 巻 72
2. 論文標題 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Amyloid- β Pathology by Modifying Microglial Function and Suppressing Oxidative Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 867 ~ 884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Taro, Hisahara Shin, Iwahara Naotoshi, Emoto Miho C., Yokokawa Kazuki, Suzuki Hironi, Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Suzuki Syuuichirou, Matsushita Takashi, Kawamata Jun, Sato-Akaba Hideo, Fujii Hirotada G., Shimohama Shun	4. 巻 145
2. 論文標題 Early administration of galantamine from preplaque phase suppresses oxidative stress and improves cognitive behavior in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 20 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanemoto Masanobu, Hisahara Shin, Hirose Bungo, Ikeda Kazuna, Matsushita Takashi, Suzuki Shuichiro, Manabe Tatsuo, Imai Tomihiro, Shimohama Shun	4. 巻 59
2. 論文標題 Severe Mononeuritis Multiplex due to Rheumatoid Vasculitis in Rheumatoid Arthritis in Sustained Clinical Remission for Decades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 705 ~ 710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3866-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shin Hisahara, Naotoshi Iwahara, Tatsuo Manabe, Mai Fujikura, Taro Saito, Kazukia Yokokawa, Naoki Gamo, Takashi Matsushita, Matsumura Akihiro, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Shun Shimohama
2. 発表標題 Involvement of SIRT6 in the morphological change of human oligodendrocyte cell lines
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Hisahara, Naotoshi Iwahara, Tatsuo Manabe, Mai Fujikura, Taro Saito, Kazuki Yokokawa, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Shun Shimohama
2. 発表標題 Deacetylase SIRT6 regulates differentiation of oligodendrocyte and modulates distribution of oligodendrocyte-specific cytoskeleton-related molecules
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin Hisahara, Naotoshi Iwahara, Tatsuo Manabe, Mai Fujikura, Taro Saito, Kazuki Yokokawa, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Shun Shimohama
2. 発表標題 Deacetylase SIRT1 and SIRT2 regulate cytoskeleton-related molecules in oligodendrocyte cell lines
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村 晃寛, 浅沼 治, 横川 和樹, 齋藤 太郎, 藤倉 舞, 岩原 直敏, 眞部 建郎, 津田 玲子, 山本 大輔, 松下 隆司, 鈴木 秀一郎, 臼井 桂子, 齋藤 正樹, 久原 真, 川又 純, 今井 富裕, 下濱 俊
2. 発表標題 神経変性疾患に対する脳血流123I-IMP-SPECTにおけるCIScore解析の検証
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 太郎, 横川 和樹, 藤倉 舞, 眞部 建郎, 岩原 直敏, 久原 真, 松村 晃寛, 鈴木 秀一郎, 松下 隆司, 川又 純, 鈴木 紘美, 江本 美穂, 藤井 博匡, 下濱 俊
2. 発表標題 Effectiveness of galantamine treatment in normal cognition phase of APPswe/PS1dE9 mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横川 和樹, 岩原 直敏, 江本 美穂, 久原 真, 齋藤 太郎, 藤倉 舞, 眞部 建郎, 松下 隆司, 松村 晃寛, 鈴木 秀一郎, 川又 純, 藤井 博匡, 下濱 俊
2. 発表標題 Rat Bone Marrow-derived MSCs Attenuate Oxidative Stress and Neuroinflammation in APP/PS1 mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 秀一郎, 鈴木 紘美, 齋藤 太郎, 横川 和樹, 藤倉 舞, 真部 健郎, 岩原 直敏, 松下 隆司, 松村 晃寛, 久原 真, 川又 純, 下濱 俊
2. 発表標題 Time course of intranigral invasion of immunocytes in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat model
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀尾 嘉幸 (Horio Yoshiyuki) (30181530)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	下濱 俊 (Shimohama Shun) (60235687)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	