

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08491

研究課題名(和文) 脳の組織形成に關するマイクロRNAが調節する分子の探究

研究課題名(英文) Exploration of molecules regulated by microRNAs involved in cerebral tissue formation

研究代表者

橋本 龍樹 (Hashimoto, Ryuju)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：90252907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究より、マウス大脳において妊娠12日から15日の間において、発現量が最も増加したlet7b-5pと最も減少したmiR409-3pであった。これらのmicroRNAによって調節されているmRNAについて、神経幹細胞を使った培養系により、microRNA導入によって発現量が変化したmRNAについてマイクロアレイ解析を行った。let7b-5pの導入によって5つのmRNAが2倍以上増加し、5つのmRNAが1/2以下に減少した。miR409-3pの導入によって、5つのmRNAが2倍以上増加し、2つのmRNAが1/2以下に減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは遺伝子発現調節は転写調節因子など遺伝子発現によって調節されていると考えられていた。しかし、近年の研究において、イントロンの部分にコードされているマイクロRNAが短期間発現することにより、短期間遺伝子発現を調節していることが分かってきた。マウス大脳の組織形成においても、2つのマイクロRNAによって10種類前後の遺伝子の発現が調節されていることが解明された。

研究成果の概要(英文)：From the previous studies, it was found that the expression level of let7b-5p was most increased and that of miR409-3p was most decreased between embryonic day12 and day 15 in pregnancy when neurons were formed in the mouse cerebrum. The mRNAs regulated by these microRNAs were identified by using a culture system using mouse neural stem cells, and the mRNAs whose expression levels were changed by the introduction of these microRNAs by using microarray analysis. As a result, the introduction of let7b-5p increased the levels of 5 mRNAs more than 2-fold and decreased the levels of 5 mRNAs to 1/2 or less. On the other hand, the introduction of miR409-3p increased the levels of 5 mRNAs more than 2-fold and decreased the levels of 2 mRNAs to less than 1/2.

研究分野：解剖学，人体発生学

キーワード：microRNA マウス胎仔 神経幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 25 年から 27 年に交付された日本学術振興会基盤研究 C による研究補助金による研究によって、中枢神経系の組織形成に関与しているマイクロ RNA (miRNA) を探索し、それらの役割を解明することを目的にこれまで研究を行ってきた。その結果、大脳皮質の神経上皮細胞が盛んに細胞分裂を行う妊娠 12 日～15 日の期間において、C57B6 マウス胎仔の終脳または大脳を取り出し、組織から抽出した RNA に含まれる 2140 種の miRNA の発現パターンについて、マイクロアレイ解析を行った。妊娠 12 日における発現量と比較して 2 倍以上増加した miRNA は、妊娠 13 日で 29 種、妊娠 14 日で 38 種、妊娠 15 日で 67 種であった。一方、妊娠 12 日における発現量と比較して 0.5 倍以下の減少した miRNA は、妊娠 13 日で 66 種、妊娠 14 日で 34 種、妊娠 15 日で 57 種であった。その中の一部の miRNA を定量的 RT-PCR 法による発現量の定量を行い、最も増加した miRNA は let7b-5p であり、最も減少した miRNA は miR409-3p であった。let7b-5p の発現部位は、妊娠 12 日においては、終脳の intermediate zone の一部の細胞の核周囲に発現を認めた。また ventricular zone (VZ) の細胞には発現を認めなかった。妊娠 15 日においては、大脳の全層に発現し、特に VZ の神経上皮細胞の脳室側に強い発現を認めた。marginal zone (MZ) と upper layer (UL) に、多くの発現を認めた。miR409-3p の発現部位妊娠 12 日においては、終脳の全層のすべての細胞の細胞質全体に強く発現していた。妊娠 15 日においては、大脳の全層の細胞に発現していたが、細胞内の核周囲に限局して発現していた。次に、発現量が最も増加した miRNA の let7b-5p の配列の蛍光物質によって標識した 2 本鎖 RNA を作製し、子宮内胎仔注入法を用いて、妊娠 13 日のマウス胎仔脳室へ注入し、妊娠 15 日に帝王切開にて母獣より胎仔を取り出した。その結果、対照群と比較して胎仔の大脳の大きさと重さには明らかな差は認めなかった。しかし、側脳室の周囲に不整を認め、盛り上がっている部位に 2 本鎖 let7b-5p を取り込んだ細胞を認めた。そこでは、2 本鎖 let7b-5p が let7b-5p の働きが抑制されることにより、ほかの部分より細胞周期が S 期の細胞を多く認め、細胞配列に乱れがあった。これらの事から、let7b-5p は細胞分裂を抑制していることが推察された。同様に、発現量が最も減少した miRNA の miR409-3p の配列の蛍光物質によって標識した 1 本鎖 RNA を作製し、妊娠 13 日のマウス胎仔脳室へ注入し、miR409-3p が脳室内で過剰な状態にするため、子宮内胎仔注入法を行い、妊娠 15 日に帝王切開にて母獣より胎仔を取り出した。その結果、取り込まれた細胞が脳室内へ脱落しており、脳室内側面が細かい凹凸があった。このように、miRNA の let7b-5p と miR409-3p はマウス胎仔期の大脳組織形成に重要な役割を果たしていることが推察されたため、本研究ではまずマウス胎仔大脳由来の神経幹細胞を用いた培養系の実験系を用いて解析した。

2. 研究の目的

これまでの研究で得られた 2 つの miRNA (let7b-5p, miR409-3p) によって調節されている mRNA を同定することを目的に、これらの 1 本鎖 miRNA 又は 2 本鎖 miRNA を神経

幹細胞へ導入し、それによって発現量が増加した mRNA を同定することにより、組織形成における miRNA の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

①マウス神経幹細胞への miRNA 導入による mRNA 発現に対する影響におけるマイクロアレイ解析

Cell Application 社からマウス神経幹細胞を購入し、培養方法の確立することができた。これまでの研究により、神経幹細胞の分化に関与しているマイクロ RNA について、妊娠 12 日から 15 日の間において、大脳で最も発現量が増加した miRNA は let7b-5p (let7) であり、その一本鎖 let7-5p (ss-let7) と二本鎖 let7-5p (ds-let7)、同時期に最も発現量が減少した miR409-3p (409) の 3 種類マイクロ RNA とすでに細胞に影響を与えないことが分かっている miRNA を神経幹細胞への導入し、それによって誘導される RNA 発現量の変化を探索するマイクロアレイ法による解析を行った。培養マウス神経幹細胞 (100,000 個/ml) へ 1 本鎖 miR409-3p (50 mM) 導入 6 時間後、RNA を抽出する。未処理の培養マウス神経幹細胞から RNA を抽出する。2 つ RNA をマイクロアレイ解析により、発現量が 2 倍以上増加している遺伝子と 0.5 倍以下に低下した遺伝子を選択する。培養マウス神経幹細胞に RNA を導入しても mRNA の発現量が増加しないことが知られている 1 本鎖 miRNA を導入し、マイクロアレイ解析を行い、未処理の培養マウス神経幹細胞の RNA と比較して、2 倍以上発現量が増加している遺伝子と 0.5 倍以下に低下した遺伝子を選択する。特定の 1 本鎖 miRNA の導入による mRNA の発現量の変化ではなく、細胞操作によるストレスによる mRNA の発現に対する影響が推定されるため、1 本鎖 miR409-3p を導入して 2 倍以上増加した遺伝子から、影響を与えない RNA を導入して 2 倍以上増加している遺伝子を除外した。1 本鎖 miR409-3p を導入して 0.5 倍以下に低下した遺伝子から、影響を与えない RNA を導入して 0.5 倍以下に低下している遺伝子を除外した。同様に 1 本鎖 let7b-5p (50 mM) 導入 6 時間後、RNA を抽出する。未処理の培養マウス神経幹細胞から RNA を抽出する。2 つ RNA をマイクロアレイ解析により、発現量が 2 倍以上増加している遺伝子と 0.5 倍以下に低下した遺伝子を選択する。培養マウス神経幹細胞に RNA を導入しても mRNA の発現量が増加しないことが知られている 1 本鎖マイクロ RNA を導入し、マイクロアレイ解析を行い、未処理の培養マウス神経幹細胞の RNA と比較して、2 倍以上に増加または 0.5 倍以下に発現量が減少している遺伝子を選択する。特定の 1 本鎖 miRNA の導入による mRNA の発現量の変化ではなく、細胞操作によるストレスによる mRNA の発現に対する影響が推定されるため、1 本鎖 let7b-5p を導入して 0.5 倍以下に減少した遺伝子から、影響を与えない miRNA を導入して 0.5 倍以下に減少している遺伝子を除外した。1 本鎖 let7b-5p を導入して 2 倍以上増加した遺伝子から、影響を与えない RNA を導入して 2 倍以上増加している遺伝子を除外した。これらの実験を 2 本鎖 let7b-5p (dslet7b-5p) でもおこなった。

②マウス神経幹細胞へマイクロ RNA 導入による細胞分裂に対する影響

dslet7b-5p と s-miR409-3p をマウス神経幹細胞へ導入後、細胞分裂に対する変化について、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を培養液に入れ、導入 6 時間後 CyQUANT NF Cell proliferation assay kit (Invitrogen)を用いて、EdU の粒子の数と細胞分裂の関係を標準曲線作成し、EdU 粒子が多い細胞の懸濁液より多くの細胞が S 期にあることを示し、dslet7b-5p と s-miR409-3p をマウス神経幹細胞へ導入後の S 期の細胞を検出した。

4. 研究成果

神経幹細胞への導入し、それによって誘導される RNA 発現量の変化を探索するマイクロアレイ法による解析を行った。その結果、導入後 s-let7 群では、発現レベルは対照群と比較して 2 倍以上増加した mRNA は、methylthioadenosine phosphorylase ほか 4 種類の mRNA であった (図 1)。 s-let7 群において mRNA は対照群と比較して半分以下減少した mRNA は、nephronectin ほか 4 種類であった (図 2)。

s-miR409-3p 群の発現レベルが 2 倍以上増加した mRNA は、olfactory receptor 910 (olfactory receptor13C8) ほか 1 種類であった (図 3)。 miR409 群において半分以下に減少した mRNA は、c-fos、thrombospondin 1 ほか 3 種類であった (図 4)。一方、let7b-5p の作用を打ち消す目的で、2 本鎖 RNA を導入した。神経幹細胞に 2 本鎖 let7b-5p (ds-let7b-5p) を導入すると、発現レベルは対照群と比較して 2 倍以上増加した mRNA は、zinc finger protein78 ほか 1 種類の RNA であった (図 5)。 ds-let7 群において mRNA は対照群と比較して半分以下減少した mRNA は、c-fos、thrombospondin 1 ほか 2 種類であった (図 6)。

miRNA のマウス神経幹細胞に対する作用について、細胞の EdU の取り込み量によって、S 期になった細胞の割合を測定した。一本鎖 miR409-3p, 2 本鎖 let7b-5p、対照実験用の miRNA を導入した神経幹細胞の細胞分裂に対する影響を解析した。その結果、一本鎖 miR409-3p を導入した神経幹細胞は、2 本鎖 let7b-5p と対照実験用 miRNA を導入した細胞と比較して、多くの EdU を

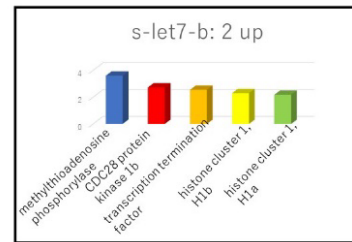


図 1 一本鎖 let7b-5p を導入した神経幹細胞において、発現量が 2 倍以上に増加した mRNA

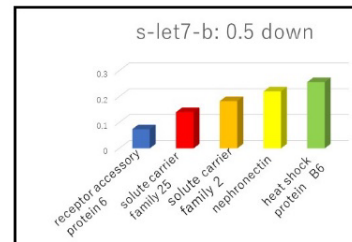


図 2 一本鎖 let7b-5p を導入した神経幹細胞において、発現量が 1/2 以下に減少した mRNA

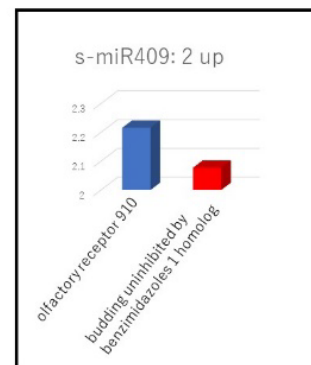


図 3 一本鎖 miR409-3p を導入した神経幹細胞において、発現量が 2 倍以上増加した mRNA

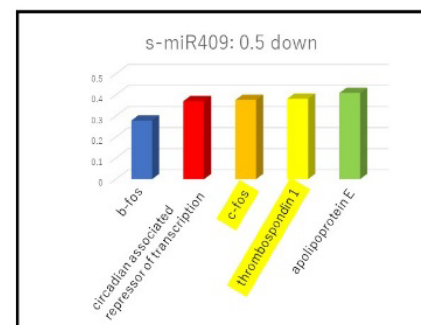


図 4 一本鎖 miR409-3p を導入した神経幹細胞において、発現量が 1/2 以下に減少した mRNA

細胞に取り込んでいた (図 7)。この結果より、一本鎖 miR409-3p は細胞分裂を抑制していることが示唆された。神経幹細胞など未分化な状態は分化すると細胞分裂が抑制されるため、miR409-3p は、神経幹細胞を分化する方向に誘導していることが示唆された。

thrombospondin 1 および c-fos は、グリア分化および神経移動に関与していることの報告があり、

妊娠 15 日のマウス胎仔大脳におけるそれぞれの局在を免疫組織学的に解析した。また、ds-let7 を脳室内に導入した妊娠 15 日のマウス胎

仔大脳と miR409-3p を導入した胎仔大脳も同様に解析した。その結果、妊娠 15 日のマウス胎仔大脳においては、thrombospondin 1 および c-fos は VZ に局在していた。

ds-let7 を脳室内に導入した大脳では、thrombospondin 1 の局在を認めなくなっており、c-fos の VZ の局在領域は減少していた。miR409-3p を脳室内に導入した大脳では、

thrombospondin 1 の VZ の局在領域は減少し、c-fos の局在を認めなかった。これらの結果から、thrombospondin 1 と c-fos は let7b-5p と miR409-

3p の調節により、局在を変化させ、大脳皮質の組織形成に関与していることが示唆された。妊娠 13.5 から

15.5 日のマウス胎仔大脳における olfactory receptor 910 (olfactory receptor13C8) の局在について、免疫組織学的解析を行った。その結果、妊娠 15.5 日マウス大脳においては、VZ と大脳表面近くの UL その局在を

認めた。しかし妊娠 13.5 日と妊娠 14.5 日のマウス胎仔大脳においては、その局在を確認することはできなかった。これらの結果より、

培養系の実験からマウス神経幹細胞が分化や増殖過程に発現する様々な mRNA がマイクロ RNA によって調節されていることが分かった。また、マイクロアレイ解析によって、変化した mRNA の一部については、翻訳産物であるタンパク質に対する免疫組織化学的解析により、マウス胎仔の大脳皮質での局在を確認することができた。マウス胎仔期における大脳組織形成に関与しているタンパク質の候補を特定することが本研究によって達成することができたが、今後の研究として、これらのタンパク質の重要性の軽重についてはわかっておらず、それぞれの mRNA の発現を抑制するために、2 本鎖 mRNA を作製し、妊娠 13 日目のマウス胎仔脳室へ注入し、その後の組織形成の変化を解析することにより、これらの疑問を解決できると思われた。

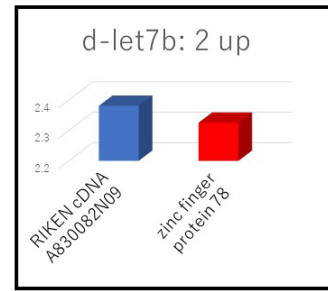


図 5 二本鎖 let7b-5p を導入した神経幹細胞において、発現量が 2 倍以上に増加した mRNA

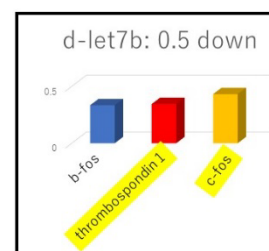


図 6 二本鎖 let7b-5p を導入した神経幹細胞において、発現量が 1/2 以下に減少した mRNA

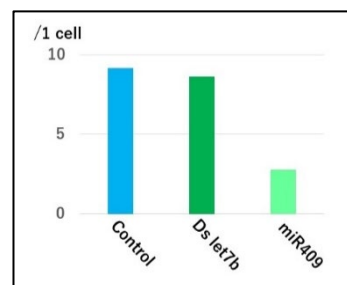


図 7 一本鎖 miR409-3p と 2 本鎖 let7b-5p を導入した神経幹細胞における S 期にある細胞の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 .1)Nishita M, Park SY, Nishio T, Kamizaki K, Wang Z, Tamada K, Takumi T, Hashimoto R, Otani H, Pazour GJ, Hsu VW, Minami Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Ror2 signaling regulates Golgi structure and transport through IFT20 for tumor invasiveness.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 2)Kaneda R, Saeki Y, Getachew D, Matsumoto A, Furuya M, Ogawa N, Motoya T, Rafiq AM, Jahan E, Udagawa J, Hashimoto R, Otani H	4. 巻 57
2. 論文標題 Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo: Possible implications for tracheo-esophageal anomalies.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 62-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本龍樹, 松本暁洋, 大谷 浩
2. 発表標題 マウス胎仔期の脳の組織形成におけるmiR409-3pの役割について
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本龍樹, 松本暁洋, 大谷 浩
2. 発表標題 脳の発生におけるマイクロRNAのマウス神経幹細胞に対する作用について
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本龍樹, 松本暁洋, 大谷 浩
2. 発表標題 ウス神経幹細胞に対するマイクロRNA(1et7b-5p and miR409-3p)導入による効果について
3. 学会等名 第42日本神経科学大会
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	大谷 浩 (Otani Hroki) (20160533)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	
研究分担者	松本 暁洋 (Matsumoto Akihiro) (70346378)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	