

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591279
 研究課題名（和文） 低酸素症における胎仔脳の保護機構：
 光学的イメージング法とマイクロ RNA による解析
 研究課題名（英文） Protection mechanism of fetal brain against severe hypoxia:
 analysis of micro RNA using with in vivo optical imaging
 研究代表者
 坂田 義行 (SAKATA YOSHIYUKI)
 山口大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号： 10034927

研究成果の概要：

胎仔脳は低酸素症に強いことが知られている。その生理的メカニズムは明らかではない。この microRNA が apoptosis 制御にどのように関与しているかを検討した。低酸素によって microRNA (miR-7b, miR-9, miR-21, miR-124a) の発現が増加した。miR7-inhibitor はカスパーゼ 3 活性を増加した。これらの結果から miR-7b は apoptosis を抑制する働きを持つことが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：胎仔脳、低酸素症、アポトーシス、マイクロ RNA、カスパーゼ 3

1. 研究開始当初の背景

胎児脳は低酸素性虚血に強いことが知られている。特に分娩時の子宮収縮に伴い、胎児は長時間低酸素状態になるが、生後殆ど重篤な脳障害はみられない。このことより脳には低酸素に対する保護機構があるのではな

いかと考えられる。私たちは母体と臍帯でつながったラット胎仔を用いて、低酸素症における胎仔脳の保護機構について研究してきた。臍帯結紮による低酸素負荷によって、細胞死 (apoptosis) の最終決定因子であるカスパーゼ 3 の活性が一時的に上昇すること、

さらに結紮解除後その活性が大きく上昇した後、元のレベルに戻ることを観察した。しかしながら、臍帯結紮解除後カスパーゼ3活性が大きく上昇しそのまま元のレベルに回復しない胎仔は死亡することを見出した。これらのことから低酸素負荷による apoptosis 発現を抑制する機構が胎児脳の保護に働いているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

最近、一部の microRNA (miRNA) は apoptosis の制御に関与することが明らかにされている。miRNA は non-coding RNA であり、すでに数百種類が発見されており、標的 mRNA に干渉することによって蛋白合成を抑制していることが知られている。また低酸素症・脳虚血によって新生仔脳に神経細胞新生 (neurogenesis) が発現し、とくに海馬の神経組織の修復を引き起こすことが報告されている。これらの所見から、一部の miRNA は低酸素症における胎仔脳の apoptosis 抑制と neurogenesis を発現することによって神経組織を修復し後遺症を防ぐための機構に働いていることが考えられる。今回、私たちは低酸素症における胎仔脳の apoptosis 制御に関与する miRNA の働きに焦点をしばり検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 胎仔脳の miRNA 発現と解析

動物は胎齢 22 日目の妊娠ラット (Sprague Dawley (SD) rat) を用い、ウレタン麻酔 (1.2-1.4 g/kg) を腹腔内投与後、保温用マットの上で体温を 36.5-37 °C に維持した。帝王切開し胎盤を剥離しないように胎仔を子宮外に取り出した。胎仔は母ラットの腹上に置き、出来る限り臍帯を腹腔内にとどめるようにした。今回は低酸素負荷のためクリップにより臍帯結紮を行った。

胎仔の肺呼吸を防ぐために鼻と口を接着剤で塞いだ。臍帯をクリップで 5 分間結紮し、臍帯結紮解除後、血管弛緩剤 (パパベリン 1% 大日本製薬) を脱脂綿に浸し臍帯においた⁸⁻¹⁰⁾。胎仔と臍帯が乾燥しないよう適度に生理食塩水を浸した脱脂綿で濡らした。低酸素負荷後 1, 3, 5 時間目にそれぞれの胎仔を再度 5 分間低酸素負荷した。胎仔の脳を取り出した。低酸素負荷を行っていない胎仔を control とした。微小カニューレを心臓左心室に刺入し生理食塩水により還流脱血した。即座に脳全体を取り出し液体窒素により瞬間凍結させた後、-76°C で冷凍保存した。

胎仔脳の miRNA の発現量の解析はバイオマトリックス研究所へ委託した。今回発現を調べた miRNA は miR-7b, miR-9, miR-21, miR-124a, miR-210 の 5 種類である。これらの miRNA は apoptosis あるいは神経新生に関連していることが分かっている。miRNA-7b は Fos 蛋白の転写を制御することで apoptosis を制御していることが知られている¹¹⁾。Fos 蛋白が過剰発現すると細胞は apoptosis を起こすことが知られている¹²⁾。また miR-21 はノックダウンされると apoptosis が促進される¹³⁾。miR-9, miR-124a は神経分化の過程で神経前駆細胞の発現を増強する^{13,14)}。miR-210 は hypoxia に応答して細胞周期の調節を行っていることが知られている¹⁵⁾。

miRNA の発現量の解析は TaqManMicroRNA Assay 法を用いた。また比較 Ct 法を用いた相対定量による解析を行った。比較 Ct 法は基準となるサンプルと比較して未知サンプルが何サイクル早く、あるいは何サイクル遅く Threshold Line に到達するかを測定する定量解析である。逆転写反応は miRNA 特異的なプライマーを用いて行い、ステムループ構造を持つプライマーを用いることで成熟 miRNA のみを認識し、反応させた。リアルタイム PCR 反応における反応条件は 95°C で 10 分間加熱した後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間のサイクルを 40 回繰り返した。この結果をもとに増殖曲線をプロットし、Threshold Line を引いた。

miRNA は 19-23 塩基ほどの 1 本鎖の RNA であり、これまでに数百種類が見つかっている。miRNA の元になる DNA 配列は miRNA の配列と、

それにほぼ相補的な逆向きの配列とを含んでおり、この DNA 配列が 1 本鎖 RNA に転写されると、miRNA 配列とその逆相補配列は相補的に結合して 2 本鎖になり、全体としてはヘアピンループ構造の primary miRNA (pri-miRNA) となる。核内にある Drosha と呼ばれる酵素がこの pri-miRNA 分子の一部を切断して pre-miRNA を作る。次いで pre-miRNA 分子は Exportin-5 と呼ばれるキャリアタンパク質によって核外に輸送され、核外に存在する Dicer と呼ばれる酵素により成熟 miRNA となる。成熟 miRNA は RISC に取り込まれ、miRNA が標的 mRNA に結合し、翻訳を抑制する。

(2) miRNA-inhibitor (miRNA-I) の作製と細胞内導入

C-9/28 (control) の miRNA 発現量を基準 (1.0) とし、それぞれの miRNA 発現量の比を比較 Ct 法により求めた。3 時間後の胎仔脳において、miR-210 以外の miRNA 発現量が増加する傾向が見られた。5 時間後においては 1 時間後の発現量と殆ど同じ量まで戻ることが観察された。各 miRNA の発現量は 3 時間後に miRNA 発現量の増加傾向を示した。また各時間と各 miRNA の間で miRNA の発現量に時間差 (3 時間後) があることがわかった ($P < 0.01$, ANOVA)。

(3) miRNA-inhibitor のカスパーゼ 3 活性に対する効果

miR7b-inhibitor (miR7b-I) の胎仔上丘への細胞内導入によって、臍帯結紮 (1 時間後) の再還流後カスパーゼ 3 活性は control に比べてより長く続いた。3 時間後においてカスパーゼ 3 活性はより大きく、持続時間も長くなった。最初の臍帯結紮から 1 時間後において、カスパーゼ 3 活性が miR7b-I 前投与によって有意に増加した ($p < 0.05$, t -test, ANOVA)。他の miR9-I, miR21-I, miR124a-I についてはカスパーゼ 3 活性はいずれも増加傾向を示した。また最初の臍帯結紮から 3 時

間後においてカスパーゼ 3 活性は有意差はなかったがいずれの miR-inhibitor によっても増加する傾向を示した。

考察

今回の実験において、miR-7b, miR-9, miR-21, miR-124a の発現が、最初の臍帯結紮から 3 時間後に増加する傾向にあることがわかった。miR-210 発現量の変化は見られなかった。私たちの以前の実験において、低酸素負荷後、1-3 時間後に apoptosis が起こることをすでに観察している。しかし 5 時間後には apoptosis を示す細胞の数が減少してきていることを見出している。これらの miRNA の一部は apoptosis を減少させる方向に働いていることが考えられる。

miR-7b は apoptosis の調節を行っていることが報告されている¹⁰⁾。miR-7b の発現が増加すると Fos 蛋白による転写が減少する。また Fos 蛋白が過剰発現すると apoptosis が誘導される¹¹⁾。このことから miR-7b の発現は Fos 蛋白の転写抑制を介して apoptosis の抑制に働いている。miR-21 はノックダウンにより apoptosis が促進する¹²⁾。このことから miR-21 の発現増加は apoptosis 抑制に働いていることが報告されている。今回の実験において、miR-7b と miR-21 の発現増加はいずれも apoptosis 抑制に働いていることを示唆している。miR-9, miR-124a は neurogenesis を促進することが知られている¹³⁾。miR-210 に関しては今回の実験では発現に変化が見られなかった。miR-210 は hypoxia に関連した遺伝子の転写制御を行うことが知られているが、神経細胞に関与しているという報告はない¹⁴⁾。このため miR-210 は神経細胞との関連性が低いと考えられる。さらに、miR7b-I による標的 miRNA のノックダウンによって結紮の 1 時間後により早くカスパーゼ 3 活性が増加することがわかった。他の miR-I (miR9-I, miR21-I, miR124a-I) についてもカスパーゼ 3 活性は増加する傾向を示した。3 時間目についてもこれらの miR-inhibitor 前投与によってカスパーゼ 3 活性は増加傾向を示した。それ故、miR-9 や miR-124a は neurogenesis のみならず apoptosis の抑制にも関与することが考えられる。さらに、複数の miRNA によ

って apoptosis と neurogenesis の制御がなされている可能性がある。このような miRNA の作用により胎仔脳は厳しい低酸素に対して apoptosis を抑制することによって脳を保護し、さらには neurogenesis を促し機能を回復することが考えられる。

今回は apoptosis と miRNA の関連性について焦点をしぼって研究を行った。また発現を調べた miRNA は数百種類存在する miRNA のごく 1 部であるため、より多くの種類の miRNA 発現とその相互作用を見る必要がある。今後さらに胎仔脳の低酸素症に対する保護機構について遺伝子レベルでより詳細に研究しなければならない。

参考文献

- 1) Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.*, **165**: 6029-6033, 2005.
- 2) Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*, **25**: 6176-6187, 2006.
- 3) Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*, **12**: 1626-1632, 2006.
- 4) Bak M, Silahatoglu A, Meller M, Christensen M, Rath MF, Skryabin B, Tommerup N, Kauppinen S. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA*, **14**: 432-444, 2008.
- 5) Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS Biol.* E60, 2003.
- 6) Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* **21**: 1857-1862, 2007.
- 7) Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience*, **139**: 555-564, 2006.
- 8) Sakata Y, Fujioka T, Nakamura S. In vivo whole-cell recording from neurons of the superior colliculus in fetal rats. *Dev. Brain Res.* **108**: 255-262, 1998.
- 9) Sakata Y, Fujioka T, Chowdhury G M I, Nakamura S. In vivo electrical activity of brainstem in fetal rats during asphyxia. *Brain Res.* **871**: 271-280, 2000.
- 10) Sakata Y, Fujioka T, Endoh H, Nakamura S. In vivo optical recordings of synaptic transmission and intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ in the superior colliculus of fetal rats. *Eur. J. Neurosci.* **23**: 1405-1416, 2006.
- 11) Lee HJ, Palkovits M, Young WS. miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 15669-15674, 2006.
- 12) Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res.* **67**: 8994-9000, 2007.
- 13) Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, **24**: 857-864, 2006.

14) Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Gene& Dev.* 21: 744-749, 2007.

15) Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* 7: 255, 2007.

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 義行 (SAKATA YOSHIYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10034927

(2) 研究分担者

中村 彰治 (NAKAMURA SHOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80112051

石川 晃教 (ISHIKAWA AKINORI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40363098

木田 裕之 (KIDA HIROYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70432739

(3) 連携研究者 なし