

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06213・19K21316

研究課題名(和文) microRNAによる劣化メカニズム制御と血液脳関門保護による抗認知症療法の構築

研究課題名(英文) Development of new anti-dementia therapies based on an approach with protecting blood-brain barrier and regulating cell senescence by microRNA.

研究代表者

外山 研介 (Toyama, Kensuke)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60793346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳の細胞老化に関連するmicroRNAを同定した。このmicroRNAを特定の組み合わせで過剰・過少発現して細胞を手早く老化させることのできる可能性を示唆する成果である。脳血管内細胞等の血液脳関門の構成細胞を手早く老化・劣化させて、認知症患者の主な背景因子である老化を考慮した基礎研究への応用に結びつく。また、認知症のリスク因子として注目されている聴覚障害にフォーカスを当て、低血小板が難聴の危険因子であることも新たに突き止めた。血小板へ介入して聴覚障害の発症を抑制することで認知症のリスクリダクションに貢献できる可能性があり、聴脳連関という視点から新しい抗認知症療法の確立につながる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会に伴う認知症患者の急増が先進各国を含めて世界的な問題となっている。我が国でも例外ではないが、認知症に対する薬剤開発は思うように進んでおらず、新たな視点での治療法の研究開発に応用可能な技術の基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)： We identified microRNAs which are associated with cellular senescence in the brain. Over-/under-expressing these microRNAs in a specific combination, cells are aged quickly. This result leads to the future applications for the basic in vitro research of aging, which is a major key factor of dementia. Since hearing impairment has been paid attention as one of the mid-life risk factors for dementia, we also focused on the research of hearing impairment. We newly identified that low platelets are a novel risk factor for hearing loss development. Suppressing the onset of hearing loss by interventions to low platelets may contribute to the risk reduction of dementia development. This is a new achievement which can lead to the establishment of new anti-dementia therapy.

研究分野：Vascular biology

キーワード：microRNA 細胞老化 認知機能障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢はあらゆる疾患の最大のリスク因子である。高齢化社会に伴う認知症患者の急増が先進各国を含めて世界的な問題となっている。我が国でも例外ではなく、近い将来には65歳以上の5人に1人が認知症と診断される時代へ突入すると警鐘が鳴らされてきた。しかし、認知症に対する薬剤開発は思うように進んでおらず、新たな視点での治療法の研究開発が求められていた。

認知症の約6割はアルツハイマー病が原因であるが、その半分以上は脳血管障害を合併する。つまり、純粋な脳血管性認知症は2割だが、アルツハイマー病の脳血管障害合併者を含めると、実に認知症全体の6-7割が脳血管障害を伴う。そこで、血管性認知機能障害という概念のもと、血管病変に主眼を置いた認知症への新たな治療戦略の確立が模索されていた。血液脳関門は、血管内皮細胞と近接するアストロサイトや神経細胞などの多種細胞同士のクロストークにより調整されており、そのバリア機能はとりわけ脳血管内皮細胞間のタイトジャンクションが基盤となって形成されている。これまでの我々の動物実験等の研究から、脳の毛細血管内皮細胞にあるタイトジャンクションの機能不全に端を発した血液脳関門のバリア機能の破綻が、認知症の病態悪化と関わっていることが明らかとなっている。実際に、ヒトの軽度認知機能障害者でも海馬領域や脳白質部に血液脳関門の破綻が思ったよりも早期から出現していることが画像検査等からも明らかとなりつつある。このことから、近年ではタイトジャンクションに着目した血液脳関門破綻の病態メカニズムの解明が、認知症の新たな治療戦略の開発につながるとして注目されている。しかし、この試みによって臨床現場での活用へと「橋渡し」された成果はまだ得られたとは言いがたい。理由として、認知症の主な背景・リスク因子である加齢を考慮した実験を行うことが生理的な環境下ではないからではと考えた。これまで細胞実験では、老化を誘導するために継代老化や細胞周期停止薬を使う等の手法が用いられてきた。しかし、継代老化は環境整備に長い時間経過を要する。また、薬剤を用いた細胞周期の修飾は強力な細胞制御であり、生理的な環境の構築とは言い難い。細胞をより早く生理的に劣化・老化させるという時短技術の開発と、将来的にその技術により劣化・老化が誘導された *in vitro*-血液脳関門モデルの確立、それを用いた創薬研究が求められていた。

### 2. 研究の目的

細胞の老化を誘導する因子やそれに関わる多くの研究報告が散見されるものの、それらの単一因子あるいは単一因子を重ね合わせるだけの手法では実際の老化を誘導することは難しく、より生理的に「劣化システム」を誘導する新たな着眼点を持った手法が必要である。複数の mRNA の翻訳抑制や分解を引き起こす microRNA は様々な病態や発生の課程において重要な役割を演じており、一度に複数の遺伝子発現を調整できることから、遺伝子発現を微調整することのできるファインチューニング的な役割があると考えられている。本研究では、老化に関連した遺伝子群を一度に微調整することのできる microRNA を探索し、細胞を劣化・加齢させる基礎的な技術の確立に結びつく成果を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) マイクロアレイを用いた microRNA のプロファイリング  
血液脳関門の構成細胞の一つであるヒト血管内皮細胞を継代老化させたサンプルを使って、Gene Chip miRNA 4.0 Array (Affymetrix 社) を用いて microRNA の発現プロファイルを解析した。
- (2) 培養細胞実験  
ヒト血管内皮細胞へ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen 社) を用いて各 miRNA mimic と (pre-miR; GeneDesign 社) inhibitor (anti-miR; GeneDesign 社) をトランスフェクションした。その後、目的の遺伝子の発現量を評価するために QIAzol Reagent (QIAGEN 社) を用いて細胞を回収した。
- (3) 定量 Real time PCR  
miRNeasy (QIAGEN 社) を用いて RNA を抽出した。DNase 処理後に ReverTra Ace (TOYOBO 社) を用いて cDNA へと逆転写した。各プライマーを用いて THUNDERBIRD SYBR Green (TOYOBO 社) でリアルタイム PCR を施行した。GAPDH を内部標準として各遺伝子発現を定量化した。

#### 4. 研究成果

継代老化させた血管内皮細胞では 17 の microRNA の発現が対照群に比して統計学的有意に 2 倍以上の変動比を示した (Fig.1A & 1B)。DIANA-mirPath V.3 解析ツール<sup>1</sup>を用いて、17 の各 microRNA がターゲット可能な細胞周期関連遺伝子を抽出した (Fig.1C; Group A)。血液脳関門の劣化を目的としていることから老化した脳で変動する遺伝子群を RNA アレイのデータから取得することとした。老化したヒトの脳皮質 (GEO accession number: GSE9990)<sup>2</sup>とラットの海馬 (GEO accession number: GSE53890)<sup>3</sup>において遺伝子発現の変化がプロファイルされたマイクロアレイデータを NCBI-GEON 公共データベースから取得し、細胞周期に関連する遺伝子群を抽出した (Fig.1C; Group B)。『Group A』と『Group B』の二群間で重複する遺伝子が 17 パターンあることになるが、遺伝子が抽出される場合 (されない場合もある) その microRNA は老化・劣化を誘導可能な候補因子となる。この手法を用いて 17 から 6 つの microRNA の候補へと絞り込んだ (has-miR-A, B, C, D, E and F)。この 6 つの microRNA が制御可能な遺伝子群について、GSE9990 と GSE53890 のデータから得た変動値を示したヒートマップを示す (Fig.1D)。この 6 つのうち has-miR-B、has-miR-D、has-miR-F が制御しえる遺伝子プロファイルが他の 3 つに比べてより多くの遺伝子発現が変動していた。

Fig.1

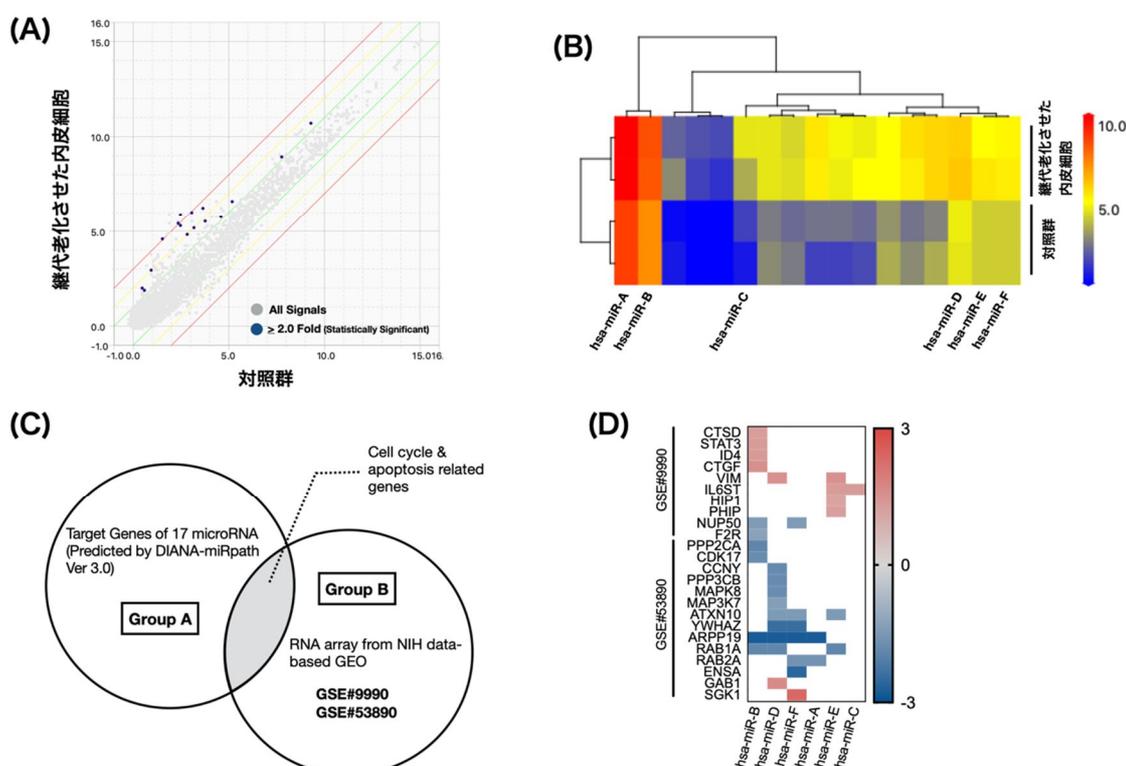


Fig.1: (A)ヒト血管内皮細胞を継代老化させた際の microRNA の発現シグナルのスクアープロット図、(B) 2 倍以上変動を示した 17 の microRNA の階層的クラスタリングのヒートマップ図、(C) *in silico* によって抽出した microRNA の標的可能遺伝子 (Group A) と RNA array の結果より抽出した老化した脳内で変動する遺伝子群 (Group B)、(D) (C) の結果より劣化誘導の候補因子となった 6 つの microRNA が制御可能な遺伝子群について、GSE9990 と GSE53890 の公共データから得た変動値を示したヒートマップ図

has-miR-B、has-miR-D、has-miR-F をそれぞれ単独もしくは複数の組み合わせ (計 7 パターン) で over-/under-expression させたときに細胞周期関連の遺伝子群の発現パターンを qPCR で実測した (Fig.2)。ポジティブコントロールである継代老化細胞で認められる発現パターン (Fig.2A) と概ね同じパターンに最も類似する組み合わせを考えた時、「has-miR-B」と「has-miR-F」が過少発現するように修飾した条件下で「has-miR-D」を過剰発現する時が最も (ポジティブコントロールの) 継代老化細胞の発現様式に類似するのではないかと考えられた。

Fig.2

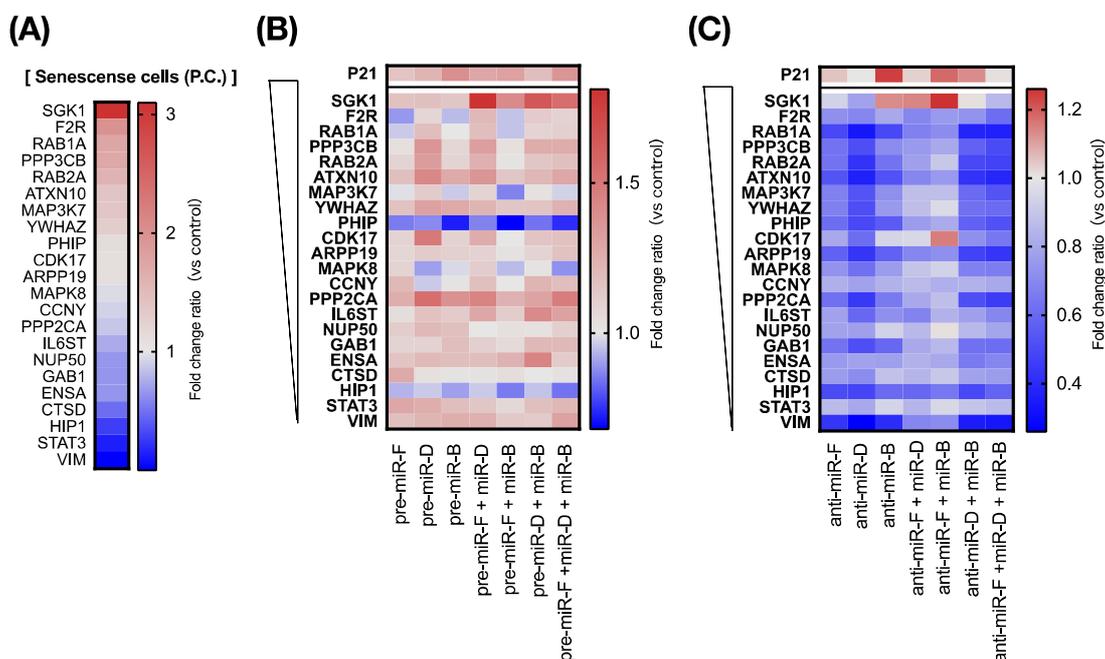


Fig.2: (A) 継代老化した細胞における細胞周期関連の遺伝子発現の変化をヒートマップに示した (ポジティブコントロール), 3つのmicroRNAを計7パターンの組み合わせで (B) 過剰発現させた時と (C) 過少発現させた時の遺伝子発現の変化を示す。

同条件で細胞を修飾したところ、ポジティブコントロールである継代老化細胞の発現パターンに近づいた (Fig.3A)。さらに、この細胞では老化マーカーとしても知られる p21 と p53 の発現が上昇していた (Fig.3B、3C)。なお、「hsa-miR-D」は細胞周期を促進するサイクリン A2 の遺伝子発現を負に制御していることも明らかとなった。高齢マウスの海馬や脳梁の白質部で has-miR-D が高発現し、サイクリン A2 が低発現していることから、has-miR-D は血液脳関門の破綻や認知症と関連している可能性が高い。

今回の研究で細胞老化の誘導の可能な 3 つの microRNA を同定することができた。我々の技術的応用が確立すると、脳血管内細胞等の血液脳関門の構成細胞に老化・劣化を生理的に手早く誘導することが可能となる。生理的な老化・劣化を誘導することの可能な時短という技をみつけ、多くの認知症患者の主要な背景因子である老化を考慮した基礎研究への応用につながることを期待する。

一方、新たな抗認知症療法を模索するために別視点での研究にも着手した。最新の研究報告によると、教育、喫煙、高血圧、肥満やアルコールなど 12 のリスクに介入することでおよそ 4 割近くの認知症を防げる可能性が指摘されている<sup>4</sup>。なかでも、聴覚の低下・喪失が健康的な生活を阻むだけでなく、認知症の独立したリスク要因として近年注目されている<sup>5</sup>。現在、国はマルチセンシングネットワークの統合的理解と制御機構の解明を戦略的創造研究推進事業の戦略目標として掲げている。しかし、聴覚障害の病態メカニズムはその多くが未解明で、そのため (特に加齢性難聴に対する) 有効な治療・予防法は未だ確立されていない。このため、我々は認知症のリスクリダクションを目的に新しい視点で聴脳連関の病態解明が急務であると考えた。今回、低血小板が難聴の危険因子であることも新たに突き止めた<sup>6</sup>。今後、血小板へアプローチをして聴覚障害の発症を抑制することで認知症のリスクリダクションに貢献する可能性について模索し、聴脳連関という別視点から新しい抗認知症療法の確立につながる成果を得たい。

Fig.3

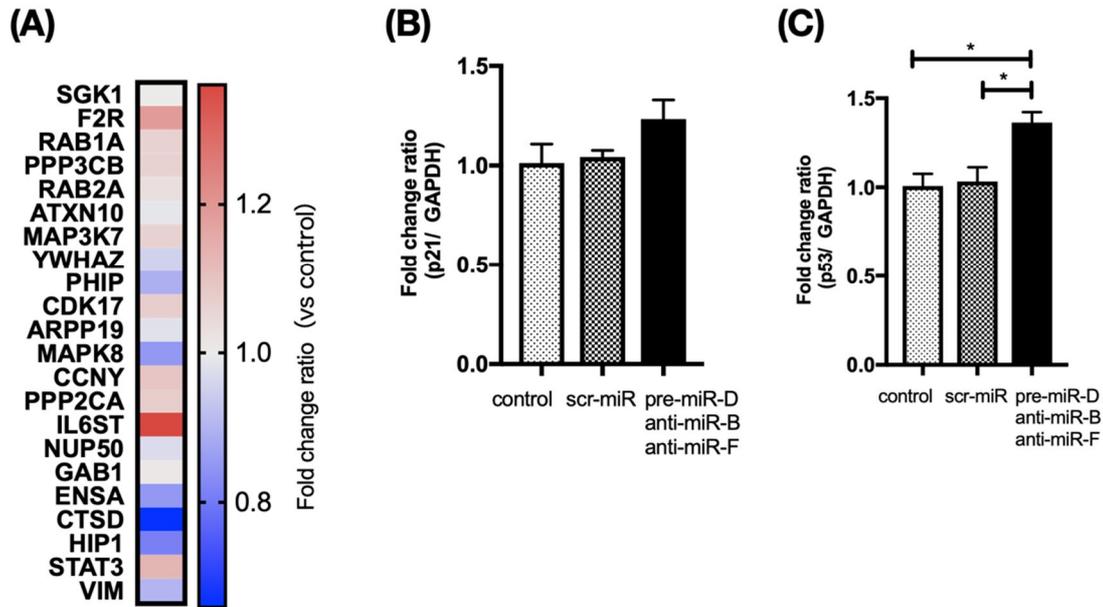


Fig.3: (A) pre-miR-D、anti-miR-B と anti-miR-F で処理したヒト血管内皮細胞での遺伝子発現の変動を示したヒートマップを示した。この細胞では老化の一般的なマーカーとして知られる (B) p21 や (C) p53 の発現も scr-miR で処理した細胞より増加していた。

<引用文献>

1. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. Diana-mirpath v3.0: Deciphering microrna function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:W460-466
2. Kadish I, Thibault O, Blalock EM, Chen KC, Gant JC, Porter NM, et al. Hippocampal and cognitive aging across the lifespan: A bioenergetic shift precedes and increased cholesterol trafficking parallels memory impairment. *J Neurosci.* 2009;29:1805-1816
3. Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, et al. Rest and stress resistance in ageing and alzheimer's disease. *Nature.* 2014;507:448-454
4. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the lancet commission. *Lancet.* 2020;396:413-446
5. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet.* 2017;390:2673-2734
6. Abe Y, Toyama K, Kazurayama M, Tanaka S, Yamaizumi M, Ueno M, et al. Low-normal platelets and decreasing platelets are risk factors for hearing impairment development. *Laryngoscope.* 2021;131:E1287-E1295

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Yasunori, Toyama Kensuke, Kazurayama Masaya, Tanaka Shinji, Yamaizumi Masamitsu, Ueno Megumi, Spin Joshua M., Hato Naohito, Mogi Masaki	4. 巻 131
2. 論文標題 Low Normal Platelets and Decreasing Platelets Are Risk Factors for Hearing Impairment Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E1287, E1295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.28970	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 該当する

1. 著者名 Toyama Kensuke, Spin Joshua M., Mogi Masaki, Tsao Philip S.	4. 巻 146
2. 論文標題 Therapeutic perspective on vascular cognitive impairment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 104266 - 104266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phrs.2019.104266	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 外山研介
2. 発表標題 microRNAに着目した認知症、動脈硬化性疾患に対する新規治療戦略の模索
3. 学会等名 第7回 日本平滑筋学会 若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外山研介
2. 発表標題 microRNAに着目した認知症に対する治療戦略開発の模索
3. 学会等名 第48回日本心脈管作動物質学会・シンポジウム（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------