

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07154
研究課題名（和文）ユビキチンリガーゼ活性を制御するmiRNAのパーキンソン病治療に対する有用性検証

研究課題名（英文）Examining the potential of miRNAs targeting ubiquitin ligase activity for Parkinson's disease treatment

研究代表者
大村 友博（OMURA, Tomohiro）
神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00439035
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病（PD）は運動障害を主徴とする神経疾患であるが、治療は対症療法が主であり、新たな作用機序に基づく薬物が必要とされている。申請者はユビキチンリガーゼHRD1や安定化因子SEL1LとPDとの関連性について研究を行ってきたが、近年microRNA（miRNA）がPD発症に関与することが示唆されている。

本研究では、SEL1Lを制御するmiRNAとしてmiR-101を同定し、miR-101がSEL1Lの発現制御を介してHRD1の発現量調節に関与し、PDモデルで生じる神経細胞死に影響を与えることを明らかにした。すなわち、miR-101はPD治療の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDの診断・評価として日常生活動作等による評価法があるが、運動機能を客観的に評価することは難しい。今回、PDモデルにおいてmiR-101発現量が変化することを考慮すると、miR-101の発現量測定が運動機能を客観的に評価する新たなツールとなり得る可能性があり、臨床において極めて有用となり得る可能性がある。

また、miRNAを介してユビキチンリガーゼを制御する治療薬は多様な薬物が臨床応用されているPDでも存在せず、本成果を発展させることで、新たな神経疾患治療薬の創製の基礎となり得る可能性も提示できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by motor impairment. Current treatment approaches primarily address symptoms, necessitating the development of new drugs based on novel mechanisms of action. While we have conducted research on the relationship between HRD1 (ubiquitin ligase)/SEL1L (HRD1 stabilizer) and PD, recent evidence suggests the involvement of microRNAs (miRNAs) in the onset of PD. In this study, we identified miR-101 as a miRNA that regulates SEL1L, and found that miR-101 exerts control over HRD1 expression by regulating SEL1L expression. Additionally, we observed that miR-101 affects neuronal cell death in a PD model. These results underscore the potential of miR-101 as a new therapeutic target for PD.

研究分野：神経化学

キーワード：microRNA ユビキチンリガーゼ パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

病棟業務に従事していると運動機能が低下している患者と遭遇することは多く、特に高齢者ではパーキンソン病 (PD) 等の神経疾患を罹患している場合がある。実際、本邦における PD 患者は、2017 年 10 月の厚生労働省による調査時点で約 16 万人を超えているが、そのうち約 90% が 65 歳以上である。

PD の診断・評価法としては日常生活動作等による評価法があるが、運動機能を客観的に評価する方法は難しい。また、PD の治療薬は病勢進行を遅らせる対症療法が主であり、罹患年齢も高齢のため複数の疾患を併存している場合が多く、治療に難渋するケースが少なくない。

PD 発症には、老化に伴う酸化ストレスの増加や遺伝的素因等多くの要因が絡むが、近年その発症原因の一つに中脳黒質緻密部における、小胞体 (ER) ストレス誘発によるドパミン神経細胞死が提唱されている。細胞は ER ストレスが続くとアポトーシスを起こして死に至るため、様々な防御機構を発動させるが、その一つが小胞体内外に存在し、蛋白質分解酵素ユビキチンリガーゼの活性化により変性蛋白質を分解・除去する機構である。

申請者はユビキチンリガーゼ HRD1、HRD1 安定化因子 SEL1L と神経疾患、特に PD との関連性について研究を行ってきた。HRD1 や SEL1L は、ER ストレス誘発細胞死に対して保護的に働くことが知られており、申請者はこれまで、HRD1 がマウス脳内において大脳皮質や海馬、中脳黒質緻密部等の神経細胞に発現しており、運動や記憶に関与する部位に発現していることを報告している。また、HRD1 が家族性・孤発性 PD モデルにおいて細胞保護効果を示すことや、孤発性 PD モデルにおいては HRD1 同様、SEL1L も強い細胞保護効果を示すこと等についても報告してきた。

一方、神経疾患発症と microRNA (miRNA) との関連性が近年報告されており、PD のドパミン神経脱落に関与する miRNA も複数報告されている。そのような中、申請者らは SEL1L を制御する可能性がある miRNA として miR-101 を見出したが、miR-101 の機能について不明な点が多く、HRD1 を含む他の分子に対する影響について詳細な解析が必要である。

そこで、miR-101 をはじめとした miRNA による HRD1 等のユビキチンリガーゼの機能制御メカニズムを解析することで、新たな PD 治療法を提示することが可能ではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

以下の研究を通して、miR-101 をはじめとする miRNA が SEL1L/HRD1 の発現を制御するか検討し、PD モデルにおいて miRNA が細胞保護効果を示すか、また薬物治療標的となり得るか展望することを目的とした。

- (1) miR-101 をはじめとする miRNA が、SEL1L/HRD1 の発現制御を介し、PD モデルの神経細胞死に影響を与えるか検討する。
- (2) miRNA データベースを用いて、HRD1 の発現を制御する miRNA を探索する。
- (3) SEL1L/HRD1 を制御する miRNA に影響を与える化合物を探索する。

3. 研究の方法

- (1) ドパミン神経 SH-SY5Y に 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) を添加することで PD モデル細胞を作製した。PD モデル細胞に miR-101 mimic や inhibitor を遺伝子導入し、SEL1L/HRD1 発現量に影響を与えるか、また細胞死に影響を与えるかについて、定量的 PCR 法やイムノプロット法、細胞死は MTT assay 法により検討した。また、SEL1L の発現を miR-101 が直接制御するかについて Luciferase assay 法により検討した。
- (2) miRNA データベースを用いて、HRD1 の発現を制御する miRNA を探索し、PD モデル細胞を用いて HRD1 の発現を制御するか否か、イムノプロット法により検討した。
- (3) miR-101 を制御することが報告されている化合物 (Melatonin 等) について、PD モデル細胞に添加し、実際に miR-101 に影響を与えるか、また SEL1L/HRD1 の発現を制御するかについて、定量的 PCR 法やイムノプロット法により検討した。

4. 研究成果

- (1) miR-101 による SEL1L の制御
miR-101 について詳細に検討したところ、miR-101 は PD モデル細胞において SEL1L の mRNA 発現量と逆相関することが確認された。そして、miR-101 mimic を遺伝子導入すると、PD モ

デル細胞における SEL1L の発現量上昇は抑制され、細胞死が増強された。一方、miR-101 inhibitor を遺伝子導入すると、その反応は抑制された。

miR-101 の標的サイトを含む SEL1L 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) の一部を挿入したレポーターベクターの野生型または変異型を構築し、SH-SY5Y にレポーターベクターと miR-101 mimic を遺伝子導入して Luciferase assay を行った。その結果、miR-101 mimic と野生型 SEL1L 3'-UTR を遺伝子導入した場合、ルシフェラーゼ活性が有意に低下したが、変異型 SEL1L 3'-UTR の場合、変化は認められなかった。

以上より、miR-101 は SEL1L の発現を制御する miRNA であり、PD モデルにおける細胞死に影響を与えることから、PD 治療における新たな治療標的となる可能性が示唆された。

(2) HRD1 の発現を制御する miRNA の探索

複数の miRNA データベースを用いて、HRD1 の発現を制御する microRNA を探索したところ、5 つの miRNA 候補を見出した。

候補 miRNA において、PD モデル細胞を用いて詳細に検討したところ、miR-34a が候補として抽出された。また、miR-34a mimic を遺伝子導入すると、HRD1 の発現量を減少させることが示された。以上より、miR-34a は PD モデルにおいて HRD1 の発現量を制御する miRNA の一つである可能性が示唆され、今後詳細な検討をする予定である。

(3) SEL1L/HRD1 を制御する miRNA に影響を与える化合物の探索

miR-101 を抑制することが報告されている複数の化合物を検討したが、良好な結果が得られなかった。

研究アプローチを変更し、まずは SEL1L を活性化する化合物を *in silico* で探索し、その後 miR-101 をはじめとした miRNA への影響について検討することとした。その結果、SEL1L の発現を制御する化合物を複数見出した。また、PD モデル細胞において細胞保護効果を示すことが明らかとなった。

今後、これらの化合物について、miR-101 をはじめとした miRNA への影響や HRD1 の関与などについて詳細に検討することで、新たな作用機序に基づく治療薬を提案することが可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Omura T, Nomura L, Watanabe R, Nishiguchi H, Yamamoto K, Imai S, Nakagawa S, Itohara K, Yonezawa A, Nakagawa T, Kunimasa J, Yano I, Matsubara K. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 MicroRNA-101 Regulates 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Death by Targeting Suppressor/Enhancer Lin-12-Like in SH-SY5Y Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 748026 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2021.748026 | 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 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Omura T, Nomura L, Watanabe R, Nishiguchi H, Yamamoto K, Imai S, Nakagawa S, Itohara K, Yonezawa A, Nakagawa T, Kunimasa J, Yano I, Matsubara K. |
| 2. 発表標題 Mir-101 regulates neuronal cell death by targeting suppressor/enhancer lin-12-like (SEL1L) in a cellular model of Parkinson's disease using 6-hydroxydopamine |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2022（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西口大生、大村友博、山本和宏、矢野育子 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼHRD1を制御するマイクロRNAの探索とパーキンソン病との関連 |
| 3. 学会等名 医療薬学フォーラム2022 / 第30回クリニカルファーマシーシンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西口大生、大村友博、佐登礼佳、北廣優実、山本和宏、國正淳一、矢野 育子 |
| 2. 発表標題 ユビキチンリガーゼHRD1を誘導する化合物の探索と神経細胞死抑制効果の検討 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|