

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16232

研究課題名(和文) Prickle2の発現を制御するmiRNAのマウスを用いた遺伝学的解析

研究課題名(英文) MicroRNA Regulation of Prickle2 Expression

研究代表者

樋口 裕城 (Higuchi, Yuki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・ポスドク研究員

研究者番号：20852982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症やうつ病などの精神神経系疾患がどのような仕組みで起こるのかを解明する目的で、神経細胞で働いている疾患関連因子を分子生物学的に分析した。第一に、自閉症関連因子としてPrickle2というタンパク質に注目し、マイクロRNAという小さなRNA3種類がPrickle2の量を調節していることを確認した。また、本研究では複数のマイクロRNAが脳内での新たな神経細胞の生成に関与している可能性を見出した。成熟した脳内での神経細胞の生成・維持機能の破綻はうつ病やアルツハイマー病などの疾患と密接に関連しており、本研究の結果はこれらの疾患の基盤メカニズムにマイクロRNAが関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経新生は哺乳類の脳内で成熟後も続く神経前駆細胞の増殖・分化・成熟とそれによる中枢神経系の維持・再構築のための内因性機構であり、その破綻は自閉症・うつ病・統合失調症等の精神疾患、アルツハイマー病等の加齢性疾患と密接に関係している。本研究はその機構の一端をマイクロRNAという小さなRNA分子が担っていることを示唆するものであり、その成果は神経新生の破綻が関与する精神神経疾患の基盤メカニズムの解明や治療・症状緩和法の開発に繋がりが得るものである。

研究成果の概要(英文)：Aiming to elucidate the mechanism underlying neuropsychological disorders, such as autism and depression, we analyzed several disease-related factors in neurons using molecular biology techniques. First, we identified three microRNA species as mediators of Prickle2, a protein related to autism. In addition, we found that several microRNA species play a role in neurogenesis, a process by which new neurons are produced in the brain. As disruption of neurogenesis in the mature brain is closely related to diseases, including depression and Alzheimer's disease, our results suggest that these microRNAs are involved in the mechanisms of these diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：神経新生 うつ 自閉症 マイクロRNA 神経新生 Prickle2

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム障害(ASD)は遺伝的要因が複雑に関与して起こる神経発達障害であり、その病理学的基盤の解明や予防法・治療法の開発が強く望まれている。研究代表者の所属していた研究グループは、これまで平面内細胞極性(PCP)と呼ばれる細胞極性の制御因子群が神経シナプスにも存在し重要な役割を担っていることを示してきたが(Nagaoka et al., Cell Rep., 2014; Nagaoka and Kishi, Neurosci Lett., 2016)、その一つ Prickle2 は、ASD と診断された患者を含む独立した複数の家族に遺伝子変異が見出されている(Sowers et al., Mol. Psychiatry 2013)。また、Prickle2 の遺伝子異常による自閉症様の行動異常はそのノックアウトマウスにおいても示されており、上記 ASD 患者で見出された Prickle2 の遺伝子変異がその病因として機能している可能性を強く示唆している。

研究代表者らは Prickle2 の発現調節機構を解析する過程で、近年注目を集めている microRNA (miRNA) に着目した。miRNA は 20 塩基長程度の小さな non-coding RNA であり、ヒトでは 2500 種類以上見つかったが、機能的には相補的塩基対の形成を以って標的 mRNA の分解を促したり翻訳を阻害したりする。Prickle2 mRNA を標的とする miRNA を見出すため、代表的な miRNA-mRNA の関係予測プログラム TargetScan (Agarwal et al., Elife, 2015) を含む 6 種類の予測プログラムを用いて解析したところ、その全てにおいて Prickle2 を標的とすることが予想された miRNA は、miR-19a、19b、148a、148b、203 の 5 つであった。興味深いことに、このうちの miR-19b は ASD 患者死後脳において発現量が増加している 16 種類の miRNA (Mor et al., Mol. Autism 2015) に含まれていた。後述するように miR-19b は実際に Prickle2 蛋白の発現を抑制する能力を有し、可能性としては、何らかの理由で発現量の増加した miR-19b が脳内で Prickle2 の発現を抑制することによって ASD の発病に関わっている、という病態が考えられる。更に、miR-19b は ASD 患児の血清サンプルにおいて発現量が上昇する 5 種類の miRNA の中にも含まれており (Mundalil Vasu et al., Mol. Autism 2014)、その病態を反映した結果であるとも推測される。

2. 研究の目的

家族性自閉スペクトラム障害に密接に関わる因子である Prickle2 の発現調節因子として miRNA が担う役割を明らかにすること

3. 研究の方法

- (1) 塩基配列をもとにした miRNA-mRNA 関係の予測プログラム (TargetScan) を用いて Prickle2 を標的としている miRNA を抽出した。
- (2) HEK293FT 細胞株に対し、Prickle2 (非翻訳領域を含む) 発現プラスミドと上記 1-1 で抽出された miRNA の発現プラスミドを共導入し、各 miRNA による Prickle2 タンパク質抑制効果を検証した。
- (3) CRISPR-Cas9 により各 miRNA をノックダウンするプラスミドを作製し、レンチウイルスにパッケージングした。マウス胎児の脳から作成した初代神経培養に対しこのレンチウイルスを感染させ、神経細胞内における内因性 miRNA を減少させた時の Prickle2 タンパク質量を測定した。

4. 研究成果

(1) バイオインフォマティクス的手法による miRNA-Prickle2 mRNA 関係の予測塩基配列を基にした miRNA-mRNA 関係の予測プログラム (TargetScan) を用いて Prickle2 を標的としている miRNA を抽出したところ、16 種類の候補 (miR-19a/b, 29a/b/c, 122, 132, 148a/b, 152, 181a/b/c/d, 203, 212) が挙げられた。その中には、ASD 患者死後脳において発現量が増加していることが報告された miR-19a (Mor et al., Mol. Autism. 2015) や ASD 患者の血中での増加が報告されている miR-19b (Vasu et al., Mol. Autism. 2014) も含まれている。

(2) 16 種類の候補 miRNA と Prickle2 の関係
配列を含む Prickle2 発現ベクターと各 miRNA の発現ベクターを HEK293FT 細胞に共導入し、各 miRNA の Prickle2 タンパク質量に対する効果をウェスタンブロットにより検証した。その結果、16 種類の miRNA すべてが Prickle2 タンパク質量を減少させた。

(3) 神経細胞における miRNA の発現
上記の miRNA の神経初代培養細胞における発現量を quantitative PCR によって定量した。Day in vitro (DIV) 4, 7, 14, 21 の神経初代培養細胞から抽出した total RNA 中の miRNA の発現量が解析された。培養開始初期から後期にかけて下降傾向を示す miRNA、上昇傾向を示す miRNA、

発現量の低いものなどに分類された。

(4) 神経細胞における内因性 miRNA の Prickle2 制御における働き
神経細胞内において、内因性の miRNA が実際に Prickle2 の制御に関わっているのかを調べる
目的で、各 miRNA のノックダウンを行った。ゲノム上の各 miRNA の配列を標的とする guide
RNA と Cas9 を発現するプラスミドをレンチウイルスベクターにより神経初代培養細胞に導入
し、それぞれの miRNA の生成を抑制するという手法 (Chang et al., *Sci. Rep.*, 2016) を用いた。
各 miRNA がノックダウンされた神経初代培養細胞の Prickle2 タンパク質量をウェスタンブ
ロットにより定量したところ、特定の3種類の miRNA がノックノックダウンされた細胞におい
ては Prickle2 が増加していた。この結果は、神経細胞内で発現しているこれらの内因性 miRNA
が実際に Prickle2 の発現量の調節に関わっていることを示唆している。

以上の結果から、自閉スペクトラム障害やてんかんと関連が報告されている因子である
Prickle2 が神経細胞内で複数の miRNA によって制御されていることが確認できた。Prickle2
の制御因子としての miRNA というトピックは新規性の高いものである。特に、miR-19 のよう
に自閉スペクトラム障害患者における増加が報告されている miRNA は、Prickle2 の制御を介
して疾患の原因となっている可能性が考えられ得るため、注目に値する。

また、本研究実施期間中の 2021 年度からは、研究代表者の異動に伴い、自閉症様行動を示すマ
ウスモデル (BTBR) に関する研究やセロトニン系抗うつ薬による神経新生と miRNA の関連を
探る研究にも参画でき、それらに関連する論文の公開や学会発表に繋がった。

原著論文

Higuchi, Y., Tada T., Nakachi T., and Arakawa, H. (2023) Serotonergic Circuit Dysregulation
Underlying Autism-Related Phenotypes in BTBR Mouse Model of Autism. *Neuropharmacology*,
237, 109634.

Higuchi, Y., Tachigori, S., and Arakawa, H. (2023) Faded neural projection from the posterior bed
nucleus of the stria terminalis to the lateral habenula contributes to social signaling deficit in
male BTBR mice as a mouse model of autism. *Psychoneuroendocrinology*, 149, 106004

Higuchi, Y., and Arakawa, H. (2022). Contrasting central and systemic effects of arginine-vasopressin
on urinary marking behavior as a social signal in male mice. *Horm. Behav.*, 141, 105128

総説

Arakawa, H., and **Higuchi, Y.** (2022). Exocrine scent marking: Coordinative role of arginine
vasopressin in the systemic regulation of social signaling behaviors. *Neurosci. Biobehav. Rev.*,
136, 104597

学会発表

Higuchi, Y. and Arakawa, H. (2022). Signalling mechanisms underlying SSRI-induced adult
neurogenesis in the mouse hippocampus. NEURO2022 (Poster, Okinawa, Japan)

Higuchi, Y. and Arakawa, H. (2022). A potential role of microRNA in antidepressant-induced adult
neurogenesis. in 24th Biennial Meeting of the International Society for Developmental
Neuroscience (Poster, Vancouver, Canada)

Higuchi, Y. and Arakawa, H. (2021). Roles of central and peripheral vasopressin in the regulation of
urinary marking behavior in male mice. in Society for Social Neuroscience (S4SN) 2021 Annual
Scientific Meeting (Poster (Video-recorded presentation), Online)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Arakawa Hiroyuki、Higuchi Yuki | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Exocrine scent marking: Coordinative role of arginine vasopressin in the systemic regulation of social signaling behaviors | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience & Biobehavioral Reviews | 6. 最初と最後の頁 104597 ~ 104597 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neubiorev.2022.104597 | 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 Higuchi Yuki、Arakawa Hiroyuki | 4. 巻 141 |
| 2. 論文標題 Contrasting central and systemic effects of arginine-vasopressin on urinary marking behavior as a social signal in male mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Hormones and Behavior | 6. 最初と最後の頁 105128 ~ 105128 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yhbeh.2022.105128 | 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 Higuchi Yuki、Tada Tomoaki、Nakachi Taiga、Arakawa Hiroyuki | 4. 巻 237 |
| 2. 論文標題 Serotonergic circuit dysregulation underlying autism-related phenotypes in BTBR mouse model of autism | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Neuropharmacology | 6. 最初と最後の頁 109634 ~ 109634 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2023.109634 | 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 Arakawa Hiroyuki、Higuchi Yuki、Ozawa Akihiko | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Oxytocin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus circuit-dependently regulates social behavior, which malfunctions in BTBR mouse model of autism | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Research Square | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-2621359/v1 | 査読の有無 無 |
| 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 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Higuchi Yuki、Arakawa Hiroyuki |
| 2. 発表標題 Roles of central and peripheral vasopressin in the regulation of urinary marking behavior in male mice |
| 3. 学会等名 Society for Social Neuroscience (S4SN) Annual Scientific Meeting 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Higuchi Yuki、Arakawa Hiroyuki |
| 2. 発表標題 A potential role of microRNA in antidepressant-induced adult neurogenesis |
| 3. 学会等名 24th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Higuchi Yuki、Arakawa Hiroyuki |
| 2. 発表標題 Signalling mechanisms underlying SSRI-induced adult neurogenesis in the mouse hippocampus |
| 3. 学会等名 NEURO2022 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|