

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19449

研究課題名（和文）虚血耐性exerciseと海馬のmicro RNAの検討

研究課題名（英文）Examination of ischemic tolerance exercise and microRNA in hippocampus

研究代表者

高田 忠幸（Takata, Tadayuki）

香川大学・医学部・寄附講座教員

研究者番号：10714272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：スナネズミの虚血再灌流障害モデルにおいて、乳酸上昇を伴わない軽運動の負荷は海馬の神経細胞を保護し、短期記憶を維持した。虚血再灌流により発現が変化したmiRNAは複数あるが、そのうち、発現が亢進した14種類のmiRNAと、発現が低下した6種類のmiRNAに関しては、虚血再灌流前に軽運動の負荷を行っておくことにより、miRNAの変化を抑制できた。つまり、これらのmiRNAは炎症、代謝、細胞死などの複数の生物学的プロセスを制御している可能性があり、これらの知見は、乳酸の上昇を伴わない軽運動が海馬のmiRNAを制御することによって、一過性の虚血後の神経細胞死と行動障害を軽減することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では乳酸上昇を伴わない軽運動は、miRNAの分子レベルにおいても虚血耐性を得たことが示された。miR-181c-5pの発現を維持したことは虚血負荷時にペナンブラに移行することの予防が可能であったことが示された。また、miR-455-3pはアミロイド（A β ）前駆体蛋白のプロセッシングを調整し、虚血による機能不全では、A β の蓄積が誘発されることが予想されたが、本研究では軽運動よりmiR-455-3pの発現も維持できたことから、A β の蓄積を予防できる可能性も判明した。乳酸上昇を伴わない軽運動は、急性の虚血障害のメカニズムのみではなく、A β 蓄積による長期的な認知機能の低下も防ぐ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In an ischemia-reperfusion injury model in gerbils, light exercise loading without lactate elevation protected hippocampal neurons and maintained short-term memory. Among several miRNAs whose expression was changed by ischemia-reperfusion, 14 miRNAs whose expression was increased and 6 miRNAs whose expression was decreased were suppressed by light exercise before ischemia-reperfusion. In other words, these miRNAs may regulate multiple biological processes such as inflammation, metabolism, and cell death, and these findings suggest that light exercise without elevated lactate may reduce neuronal cell death and behavioral deficits after transient ischemia by regulating miRNAs in the hippocampus.

研究分野：老化，認知症，リハビリテーション

キーワード：Micro RNA 海馬 虚血再灌流 短期記憶 虚血耐性運動 乳酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA はタンパク質をコードしない小型一本鎖 RNA である。この miRNA が標的 messenger RNA (mRNA) の翻訳の中断あるいは遺伝子発言を制御していることが明らかとなってきた。脳虚血における神経細胞障害の機序においても miRNA が重要な役割を担う可能性が指摘されているものの、いまだ詳細な機構は解明されていない。例えば miRNA-132 は、海馬ニューロンを酸素グルコース欠乏誘発アポトーシスから保護すること、miRNA-216a のアップレギュレーションは JAK2/STAT3 関連アポトーシス及び、炎症経路を負に調節することによって虚血性損傷に対する神経保護効果を発揮すること、miRNA-137 は、Notch シグナル伝達経路の調節を介して虚血/再灌流傷害からニューロンを保護すること等の報告があり、内因性の強力な細胞保護機構である虚血耐性減少においても miRNA を介した遺伝子修飾の役割が予想されている。本研究では miRNA の解析を組み入れることで、虚血耐性運動が上記のようなこれまで報告されている miRNA の upregulate や downregulate をどのように変化させるか提示し、虚血治療の対象となりえる miRNA を示し得るかが重要と考える。

2. 研究の目的

脳虚血負荷後の海馬のエクソソーム中の miRNA の発現を測定し、運動負荷の有無でその profile の変化を解析することで、以下の点を明らかにする。

- 1) 脳虚血負荷後のスナネズミの海馬において、特異的に増加または減少する海馬エクソソーム中の miRNA を同定する。脳虚血における神経保護作用を示すかを明らかにする。
- 2) 1) において運動負荷の有無で変化する miRNA を同定し、虚血状態の脳に対して治療対象となりえるか検討する。
- 3) 組織学的に細胞脱落・変性の状態と 1)、2) を比較し、組織学的に細胞脱落・変性を認めず、miRNA の特異的な変化を示すものを抽出する。それらが脳虚血状態において、神経保護的作用を示す蛋白を同定し、神経保護の治療ターゲットになり得るか検討する。
- 4) 乳酸値から虚血耐性運動の強度を評価する。低コストで簡便なトレッドミル運動がどれくらい有効か確認する。

3. 研究の方法

1. 対象

27 匹の雄のスナネズミを 3 グループに分け、exercise plus ischemia group, ischemia group, sham operation group とし、各 9 匹ずつ割り当てる。

2. 方法

全てのスナネズミは自由に食物と水分を摂取できる環境に置く。

1. のグループでは運動負荷前乳酸値を測定後、15m/min、5%の傾斜、30 分間のトレッドミルでの運動負荷を、週 5 日、4 週間継続する。
2. 運動負荷終了直後に、乳酸値を測定する。
3. ペントバルビタールとケタミン/キシラジンで麻酔し、頸部皮膚切開を行い、両側頸動脈を同定する。マイクロ動脈瘤クリップで両側総頸動脈を 5 分間閉塞後に閉塞を解除し、一過性全脳虚血状態とする。その後閉創する。
4. 72~96 時間後に Y 字型迷路試験を施行し、8 分間にわたって迷路内を自由に探索させ進入したアームを順に記録する。動物が測定時間内に各アームに進入した回数(総アーム進入回数)および連続して異なる 3 本のアームに進入した組み合わせの数(交替行動数)を調べ、以下の式より交替行動率(%)を算出し、短期記憶の指標とする(交替行動率% = 交替行動数 ÷ (総アーム進入回数 - 2) × 100)。
5. 4. の後にペントバルビタールで麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で還流後に 4%パラホルムアルデヒド(PFA)で還流固定を行う。脳を採取し、片側大脳の海馬を組織標本用に、他方の片側大脳の海馬を miRNA 測定用に保存する。
6. のグループではと同様な環境で飼育をするが、運動負荷をかけず、と同様な検査や処置を施行する。
7. のグループではと同様に飼育、検査、処置をするが、頸動脈を閉塞せず露出のみを行い、そのまま皮膚を縫合のみ行う。

血液乳酸値の測定

スナネズミの尾部から 30G 穿刺針で血液を採取し、経皮的血中乳酸測定器キット(arkray 社、ラクテート・プロTM2 LT-1730)を用いて測定する。

組織学的評価

各群 1 匹は組織学的評価用に標本を作製した。前額断で 6 μ m 厚のパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色で海馬体 (CA1 の神経細胞を 4 区画に分けてカウント) の単位長当たりの神経細胞の数を測定する。神経細胞の核を同定できるものをカウントの対象とする。

本研究の研究対象であるエクソソームを以下の手順で回収する。

1. サンプルを TissueLyser を用いてホモジナイゼーションを行い、15~25 °C で 5 分間放置する。
2. 140 μ l のクロロホルムを添加し、15 秒激しく混和後、15~25 °C で 2~3 分間放置する。
3. 4 °C、12,000 \times g で 15 分間遠心操作を行う。
4. 上清をコレクションチューブに移し、1.5 倍容量の 100%エタノールを添加し、混和する。
5. 2ml コレクションチューブの中にセットした RNeasy Mini (QIAGEN 社, RNA isolation kit) スピнкаラムに最大 700 μ l のサンプルをピペットでアプライする。15~25 °C、8,000 \times g 以上で 15 秒間遠心操作を行う。ろ液は破棄する。4. の残サンプルを繰り返しこの工程を行う。
6. 500 μ l の Buffer RPE (QIAGEN 社, 洗浄バッファー) を RNeasy Mini スピнкаラムにピペットで添加する。8,000 \times g 以上で 15 秒間遠心してカラムを洗浄し、ろ液は破棄する。
7. RNeasy Mini スピнкаラムへ 500 μ l の Buffer RPE を添加する。8,000 \times g 以上で 2 分間遠心操作する。
8. RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 1.5ml コレクションチューブに移し、30~50 μ l の RNase フリー水を直接 RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンにピペットでアプライする。8,000 \times g 以上で 1 分間遠心操作を行い、RNA を溶出する。

エクソソーム中の miRNA の解析

miRNA 発現の解析には miRNA アレイチップを用いて、以下の示す手順で行う。それぞれのエクソソーム溶液から miRNA を回収し (Ambion 社, mirVanaTM miRNA isolation kit)、これをアレイ用のサンプルとする。miRNA アレイ (東レ) に、標識 (Ambion 社, mirVanaTM miRNA labeling kit) したサンプルをハイブリダイゼーション後、アレイ用スキャナー (当研究グループ保有) でスキャンを行う。その後解析ソフトウェア Array-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics, Inc.) を用いて得られたイメージ画像 (TIFF 画像, 16bit 形式) から、各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行い、シグナル値を算出し miRNA を同定する。、群の miRNA 発現プロファイルをクラスター解析も含めた統計学的解析を行う。有意な変動を認められた miRNA については、miRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量する (Thermo Fisher Scientific 社, Taqman MicroRNA Assays)

4. 研究成果

CA1 の神経細胞は 群でのみ優位な神経細胞の脱落を認めた。自発行動量は各群に有意差を認めなかったが、短期記憶は 群で低下し、 群では保たれていた。乳酸値は各群に有意差を認めなかった。虚血により変化を来とし、かつ、虚血耐性運動を負荷することで保存された miRNA は 20 種あり、虚血によるアップレギュレートが軽運動で抑制された miRNA は 14 種 (mmu-miR-211-3p, -327, -451b, -711, -3070-3p, -3070-2-3p, -3097-5p, -3620-5p, -6240, -6916-5p, -6944-5p, 7083-5p, -7085-5p, and -7674-5p)、虚血によるダウンレギュレートが軽運動で抑制された miRNA は 6 種 (mmu-miR-148b-3p, -152-3p, -181c-5p, -299b-5p, -455-3p, and -664-3p) 認めた。

以上の結果から、乳酸上昇を伴わない軽運動は、組織学的に CA1 の神経細胞を保存し、短期記憶を維持することから組織学的にも認知機能的にも虚血耐性を得たことが示された。変化を認めた miRNA のいくつかのメカニズムがこの効果につながる可能性がある。特に、miR-181c-5p は脳虚血との関連が報告されており、miR-181c-5p は虚血の程度が強いと上昇し、ペナンブラでは低下することから、虚血耐性運動により虚血負荷時にペナンブラに移行することの予防が可能であったことを miRNA レベルで示すことができた。また、miR-455-3p は認知機能との報告があり、アミロイド 前駆体蛋白 (APP) のプロセッシングを調整し、APP により誘導されるミトコンドリアやシナプスの異常に対して保護的な機能が報告されており、ダウンレギュレーションによりこれらの機能喪失を来し、アミロイド (A β) の蓄積が予想される。今回の結果からは虚血耐性運動により miR-455-3p の発現は維持できたことから A β の蓄積を予防できる可能性がある。これらの結果から、乳酸上昇を伴わない軽運動は、miRNA のレベルで虚血耐性を獲得し、認知機能を維持できることが示された。急性障害のメカニズムに起因する短期記憶の低下のみならず、アミロイド蓄積などの慢性メカニズムに起因する長期的な認知機能の低下を防ぐ可能性があることを示している。

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 0件）

1. 著者名 Takata Tadayuki, Nonaka Wakako, Iwama Hisakazu, Kobara Hideki, Deguchi Kazushi, Masugata Hisashi, Touge Tetsuo, Miyamoto Osamu, Nakamura Takehiro, Itano Toshifumi, Masaki Tsutomu	4. 巻 1732
2. 論文標題 Light exercise without lactate elevation induces ischemic tolerance through the modulation of microRNA in the gerbil hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146710 ~ 146710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.146710	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tadayuki Takata, Wakako Nonaka, Hisakazu Iwama, Hideki Kobara, Kazushi Deguchi, Hisashi Masugata, Tetsuo Touge, Osamu Miyamoto, Takehiro Nakamura, Toshifumi Itano, Tsutomu Masaki
2. 発表標題 Light exercise induces ischemic tolerance through modulation of microRNAs in the gerbil hippocampus
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021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
---------	---------