

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06373

研究課題名(和文)ニューロンマイクロRNAがグリア細胞に与える影響と役割

研究課題名(英文)Influence and its role of neuronal microRNAs to glial cells.

研究代表者

佐貫 理佳子 (Sanuki, Rikako)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・博士研究員

研究者番号：50607471

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)：マイクロRNA-124(miR-124)は左右対称動物に共通して発現する神経細胞のマイクロRNAである。神経細胞が損傷を受けると、miR-124を含むエクソソームが放出され、グリア細胞の質的变化に寄与するといわれているが、その再現性や具体的なメカニズムを含め、依然として多くの疑問が残されている。本研究ではショウジョウバエとマウスのグリア細胞にmiR-124を発現させ、神経組織損傷時にどのような役割を果たすのかについて検証することを試みた。少なくともショウジョウバエにおいては、グリア細胞にmiR-124が発現していても、損傷時の回復には寄与しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経組織は損傷すると、ほとんど不可逆的なダメージを受ける。神経細胞から損傷時にエクソソームを介して放出されたmiR-124にどのような役割があるのかを検証し、明らかにすることは、損傷時にグリア細胞にどのような処置を施すべきかを知るためには重要である。本研究結果は、脳損傷時におけるグリア細胞は、miR-124を発現していないほうが良い事を支持している。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA-124(miR-124) is a neuronal microRNA commonly expressed in bilaterians. While it is proposed that when neurons are damaged, exosomes containing miR-124 are released and contribute to qualitative changes of glial cells, many questions still remain, including the reproducibility and specific mechanisms. In this study, researchers expressed miR-124 in glial cells of Drosophila and mice, and attempted to examine its role in neuronal tissue damage. We found that, at least in Drosophila, expression of miR-124 in glial cells does not contribute to recovery from injury.

研究分野：神経化学

キーワード：脳損傷 グリア細胞 miR-124

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現は DNA にコードされた遺伝情報がタンパク質として産生されるメカニズムであり、個体の発生や成熟のみならず、癌、損傷応答など、全ての生物活動における生理機能の決定に重要な役割を果たしている。遺伝子発現を制御するメカニズムの中で、マイクロ RNA による遺伝子発現制御は 1993 年に初めて発見されたが、海綿動物はマイクロ RNA による制御機構を有しており、動物進化の初期の段階(先カンブリア時代)から利用されていたと考えられている。また動物界の中でも、その発生に軸を有する左右相称動物に共通したマイクロ RNA は 34 種類知られているが、マイクロ RNA-124 (miR-124) はそのうちの 1 つである。左右相称動物の最も重要な特徴の一つは脳とよべる組織を有していることである。miR-124 は生物に共通して神経細胞に非常に高く発現している。

脳などの神経組織が破壊された場合、その再生が期待できる見込みは非常に低い。その一因として、グリア細胞の性質の変化があげられている。このため、グリア細胞の機能変化を理解することは重要である。ニューロンが損傷を受けると、miR-124 を含むエクソソームが放出され、そのエクソソームはグリア細胞にも取り込まれる。miR-124 がグリア細胞による神経の保護に寄与する可能性が示唆されているが、その再現性や具体的なメカニズムを含め、依然として多くの疑問が残されている。

2. 研究の目的

通常、miR-124 はグリア細胞に発現していない。そのため、miR-124 をグリア細胞に発現させ、脳損傷時に保護的な役割を發揮するのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエは GAL4/UAS システムによって任意の遺伝子を任意の組織や細胞に強制発現することができる。そこで、UAS 制御下で miR-124 と GFP を発現するショウジョウバエを作製し、*repo-Gal4* ショウジョウバエと掛け合わせてグリア細胞に miR-124 を発現させた。同ショウジョウバエに外傷性脳損傷を与え、7 日後の生存率を調べた。

マウス網膜のグリア細胞特異的に miR-124 を発現させるために、プラスミド DNA である *pGfap-NLS-DsRed-intron-miRNA-124-3xFL* と *pGAG-AcGFP* をエレクトロポレーション法によってマウス網膜に導入した。生後 14 日目のマウス網膜の切片を作製し、一次抗体として Mouse anti-FLAG[®] M2 (1:3000) (Sigma-Aldrich #F1804)、Rabbit anti-SOX9 (1:1000) (Abcam #ab185966)、Rat anti-GFP (1:1000) (NACAL TESQUE #M7H8151)、二次抗体として Alexa Fluor[®] 488 Donkey anti-Rat IgG (1:400) (Invitrogen #A21208)、Alexa Fluor[®] 546 Donkey anti-Mouse IgG (1:400) (Invitrogen #A10036)、Alexa Fluor[®] 647 Donkey anti-Rabbit IgG (1:400) (Invitrogen #A31573) を用いて染色し、観察した。

4. 研究成果

(1) miR-124 のグリア細胞強制発現ショウジョウバエ

グリア細胞特異的に miR-124 を強制発現した成虫の数について解析した。*repo-Gal4* で miR-124 と GFP を強制発現させた場合 (*repo>miR-124-GFP*、対象は *repo>GFP*)、成虫ではオスの強制発現個体はおらず、全てメスの個体が得られた(図 1)。次に、メス

個体の *repo>mir-124-GFP* と *repo>GFP* の脳切片を用いて、GFP 陽性グリア細胞数を比べた。その結果、GFP 陽性細胞の数に差は見出されなかった(図 2)。この他、顕著な運動能力の差もなく、少なくとも成虫となった *repo>miR-124-GFP* は、*repo>GFP* と差はなかった。次に、ショウジョウバエに穿通性外傷性脳損傷(TBI)を与え、7 日後の生存率について調べた。その結果、miR-124 をグリア細胞に強制発現した場合には、*repo>GFP* と比べて生存率が低下した。以上の結果より、少なくともショウジョウバエにおいては、グリア細胞に miR-124 を強制発現しても、脳損傷時に個体にとって有利にならないことが明らかとなった。

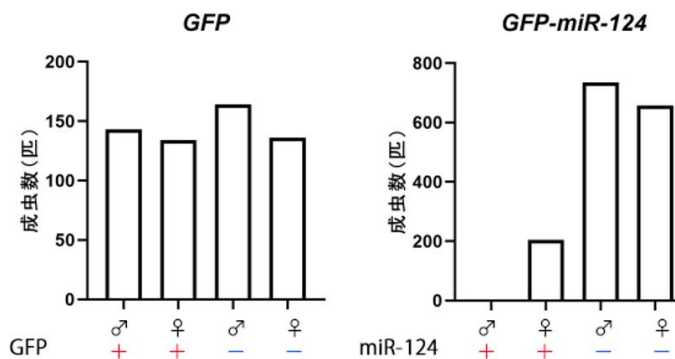


図 1 . *repo>miR-124-GFP* 成虫はメスのみである。

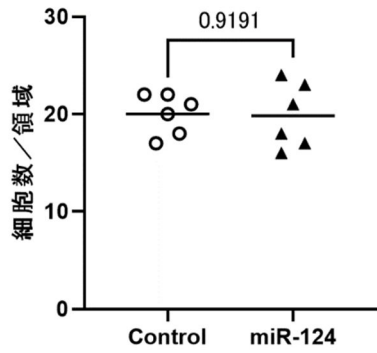


図2 . *repo>miR-124-GFP*を発現するグリア細胞の数は、Control (*repo>GFP*) と差がない。

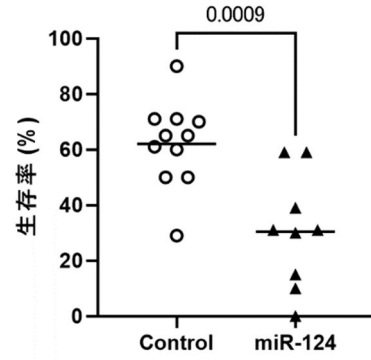
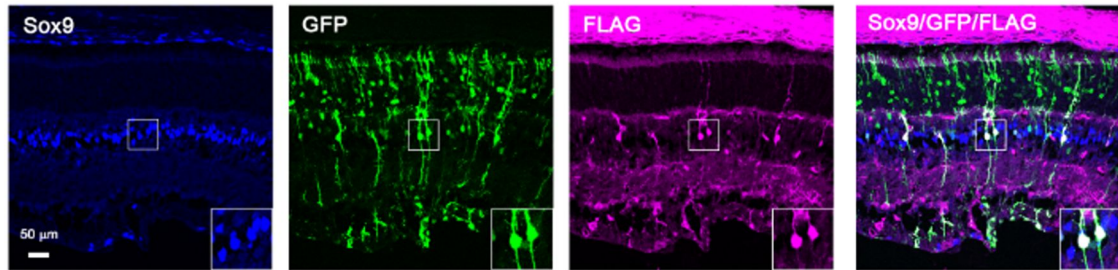


図3 . グリア細胞にmiR-124を発現させると、TBIによる生存率が低下する。

(2) miR-124 強制発現ミューラーグリア細胞

次に網膜にエレクトロポレーションによってmiR-124-DsRed-Flag (対象はDsRed-Flag) を遺伝子導入した。*Gfap* プロモーターの下流で遺伝子発現を誘導し、網膜のグリア細胞であるミューラーグリア細胞にmiR-124を強制発現した。この時、ユビキチンプロモーターであるCAGを用い、GFPも同時に遺伝子導入をした。その結果、DsRed-Flagの場合は、ミューラーグリア細胞に特異的な遺伝子発現が可能であったが、miR-124-DsRed-Flagでは、Flag陽性細胞はミューラーグリアマーカー(SOX9)を発現していなかった(図4)。今後、発現させる量やタイミングを検討する必要がある。

Control



miR-124

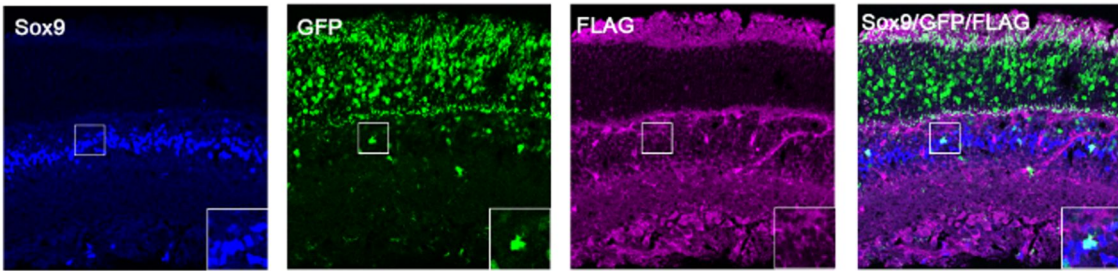


図4 . *pCAGGS-GFP*と*pGfap-DsRed-FLAG*もしくは*pGfap-miR-124-DsRed-Flag*をマウス網膜に強制発現した。コントロールではDsRed-FLAGを発現するミューラーグリア細胞が存在しているのに比べ、miR-124を強制発現しているミューラーグリア細胞は検出されなかった。

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 Sanuki, R., Yamamura, T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Tumor Suppressive Effects of miR-124 and Its Function in Neuronal Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115919	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0件

〔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
研究 分 担 者	高野 敏行 (Takano Toshiyuki) (90202150)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授 (14303)	

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