

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791957

研究課題名（和文） microRNA を用いた末梢神経障害における新たな神経再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of the novel nerve regeneration therapy for the peripheral neuropathy using microRNA

研究代表者

古賀 陽子（KAWASE-KOGA YOKO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10392408

研究成果の概要（和文）：本研究は、顎顔面領域における末梢神経障害に対する神経再生の治療開発を目指し、まず中枢神経系の幹細胞に着目して脳特異的に全ての microRNA の発現を抑制させた *Dicer* コンディショナルノックアウトマウス (*DicerCKO*) を用いて、神経幹細胞の増殖能、分化能、および神経幹細胞における miRNA の分子メカニズムを解明するために、プロテオミクス解析を行った。そして、*DicerCKO* は、増殖能は低い自己複製能を有し、異質な分化能を示した。また、プロテオミクス解析にて細胞死に関わる因子が検出された。

研究成果の概要（英文）：We have focused on the functions of neural stem cell in central nervous system to develop the novel nerve regeneration therapy for the peripheral neuropathy using *Dicer* conditional knockout mouse (*DicerCKO*). We have identified a population of *Dicer*-deficient NSCs that can self-renew, but show low proliferation. Moreover, *Dicer*-deficient NSCs display abnormal differentiation and undergo cell death when mitogens are withdrawn. *Dicer* deletion affects the levels of many proteins, as revealed by a mass spectrometry proteomic approach. We have found that an increase of anti-survival and/or pro-apoptosis proteins and a decrease of pro-survival and/or anti-apoptosis proteins contribute to the cell death of *Dicer*-deficient NSCs, implying a general role for *Dicer* in protecting cells from apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系歯学、口腔顎顔面再建外科学

キーワード：神経幹細胞、神経損傷、microRNA、再生医療、末梢神経

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における末梢神経障害、すなわち①炎症、外傷に起因する顔面神経麻痺、②術後に生じる顔面神経麻痺、舌神経麻痺、オトガイ神経麻痺、③抗腫瘍剤による感覚障害に

対して、ビタミン B12 や三環系抗うつ薬の投与、レーザー治療、理学療法、再建術などが用いられているが、完全治癒が困難とされており、確立された治療法がないのが現状である。そして、これらの末梢神経障害に対する

神経再生は、顎顔面領域のみならず、形成外科、整形外科、神経内科領域などにおいても重要な課題となっている。そこで、末梢神経障害の神経再生の治療開発に向けて、末梢神経が中枢神経と体の各部位を結び働きをすること、また末梢神経が中枢神経と繋がる場所はすべて決まっていることなどから中枢神経系幹細胞に着目した。そして基礎的な性情解析、すなわち、幹細胞の増殖および分化を制御する機構や分子生物学的レベルでの解析が必要であると考えた。さらに、中枢神経系幹細胞と研究代表者がこれまで研究してきており、新たな治療法のアプローチとして注目されている microRNA を結びつけることにより、より一層神経再生に向けた治療法の開発に近づくと考えた。

Non-coding RNA と呼ばれる microRNA (miRNA; 18-25 塩基の小さな RNA) は、標的遺伝子のメッセンジャーRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) と部分的な相補鎖を形成し、翻訳を抑制することが知られている (He, L&Hannon, G, J, Nat. Rev. Genet., 2004)。マウスの脳においては、現在 500 以上の miRNA (mir-124, miR-181b, miR125b 等) が存在することが明らかになっているが、それぞれの miRNA の役割は未だ不明である。しかし、マウスの脳を材料にして miRNA の役割を一つ一つ解析するのは、非常に困難である。そこで、研究代表者は、RNAIII ファミリーに属する切断酵素であり、細胞質内で miRNA 前駆体を切断して成熟 miRNA を生成するのに必要不可欠な因子である *Dicer* に着目した。そして、中枢神経系の中でも大脳皮質特異的に *Dicer* を欠損させたマウスを用いて、網羅的に miRNA の生成を阻害し、脳における miRNA の役割を解明することをまず目的とした。*Dicer* 欠損マウスは、胎生 7.5 日で致死することが知られている (Bernstein, E. et al., Nat. Genet., 2003)。そのため、胎生 7.5 日目以降という脳の形態形成に重要な時期の *Dicer* ならびに miRNA の機能解析は、不可能である。この問題を解決するために、大脳皮質特異的 (Emx1-Cre) に *Dicer* を欠損させたコンディショナルノックアウト (*Dicer* CKO) マウスを Cre/loxp システムを用いて作製した。そして期待通り、出生後 30 日前後まで生存するという、申請者の研究目的に理想的なマウスを得ることに成功した。この *Dicer*CKO マウスを用いて、出生後と胎生期の 大脳皮質における *Dicer* ならびに miRNA の機能

解析を行い、*in vivo* において以下の結果が得られた。

(1) 出生後 5(P5)日目, P14 日目の *Dicer* CKO マウスは、野生型 (*Dicer*<sup>+/loxP</sup>) と比較して矮小な大脳を呈するという、非常に興味深い形態学的異常を示した。

(2) P5 日目の脳の形態において、大脳皮質は野生型と比較して著しく薄く、海馬の欠損といった明らかな形態学的差異が認められた。

(3) アポトーシスの発現が、E12.5 日目から P14 日目まで認められた。

(4) 神経幹細胞・前駆細胞マーカーの発現 (*Pax6*, *Nestin*, *Tbr2*, *Hes5*, *Ng2*,  $\beta$ -catenin) の減少が確認された。

(5) *Dicer* CKO マウスにおいて細胞周期の延長や細胞周期からの離脱は認められたが、野生型と比較して有意な差は得られなかった。

(6) 神経細胞への分化マーカーの発現 (*Tbr1*, *Cux1*, *Cux2*, *NF*, *Tuj1*) は *Dicer* CKO マウスにおいて極性を欠いていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、顎顔面領域において治療が困難と考えられている神経障害、特に末梢神経障害に対する新しい神経再生の治療開発を目指すことを目的としている。そこで、まず基礎的な分子生物学的解析が必須であると考え、神経系特異的に全ての microRNA の発現を抑制させた *Dicer* 遺伝子操作マウスの神経幹細胞を用いて、顎顔面領域における神経損傷・障害と関連する遺伝子を同定し、将来的には末梢神経再生の治療に結びつける。

## 3. 研究の方法

研究代表者がこれまでに作製した大脳皮質特異的 *Dicer* コンディショナルノックアウトマウス (*Dicer* CKO) を用いて、*in vivo* の結果を踏まえ、*in vitro* の系において野生型と比較して次の検討を行った。

(1) ニューロスフェア法を用いて、神経幹細胞の増殖・分化制御機構の検討、また *Dicer* の発現の有無をウエスタンブロット法、ノーザンブロット法を用いて行った。

(2) metaphase spreads 法を用いて染色体の核型、免疫染色を用いて DNA メチル化の異常の有無の検討を行った。

(3) 神経幹細胞における miRNA の分子メカニズムを解明するために、プロテオミクス解析を行い、(ニューロスフェアからタンパク質を抽出→SDS-PAGE (1D-gel) を用いて電気泳動によりタンパク質を分離→ゲルを染色→切り出し、トリプシン処理しペプチドに分解

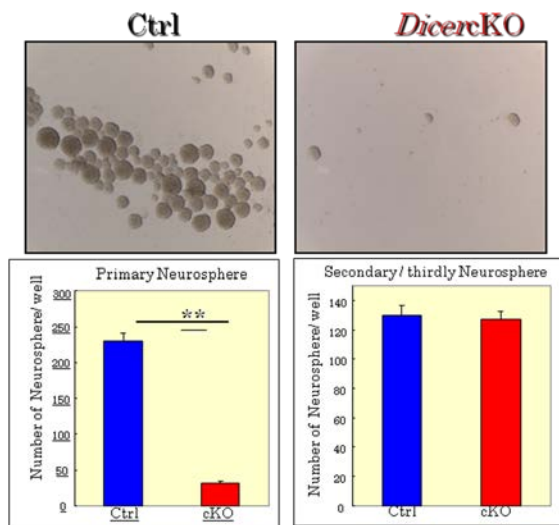
→mass spectrometry を用いて、個々のペプチドの構造情報をデータベース中の配列と比較し、タンパク質を同定)、野性型と *DicerCKO* マウスのタンパク質の発現レベルの差異を網羅的に検索した。

#### 4. 研究成果

(1) 神経幹細胞の増殖・分化制御機構の検討

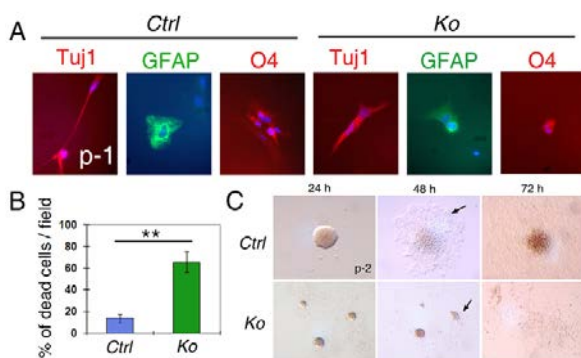
①増殖能の検討では、*DicerCKO* において顕著な神経幹細胞（ニューロスフェア）の減少と増殖能の低下が認められた。また、*DicerCKO* のニューロスフェアが自己複製能を有していることが確認できた(図 1)。

図 1



②*DicerCKO* のニューロスフェアの分化能の検討においては、神経分化マーカーの Tuj1, GFAP, O4 の発現にアブノーマルな神経分化を認めた (図 2 A-C)。

図 2

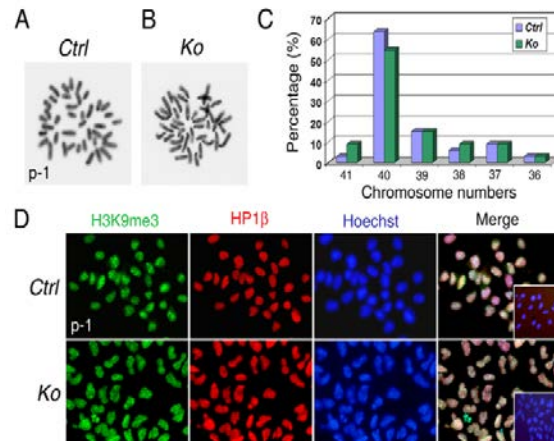


(2) 染色体の核型、免疫染色を用いて DNA メチル化の異常の有無の検討

①*DicerCKO* の染色体の核型 (カリオタイプ) の検討を行い、マウスの染色体数 (2n=40) に異常は認めなかった (図 3A-C)。

②DNA のメチル化を検討するために、H3K9me3 および HP1 $\beta$  の発現の有無や差異を検討した。その結果、*DicerCKO* のニューロスフェアに H3K9me3 および HP1 $\beta$  の発現は認められたが、核の形態が肥大傾向にあり、ヘテロクロマチン構造に影響していることが示唆された(図 3D)。

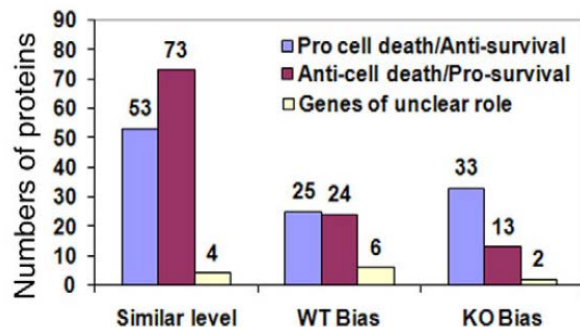
図 3



(3) プロテオミクスによる解析

プロテオミクス解析を行い野性型と *DicerCKO* マウスのタンパク質の発現レベルの差異をスクリーニングし、2900 以上のタンパク質を同定した。その中でも、特に有意な差を認めたのは、細胞の生命を制御するタンパク質が *DicerCKO* マウスにおいて発現が有意に減少していた (図 4)。特に、fragile X mental retardation protein1(FMR1)におけるシグナル伝達に関与していることがわかった。

図 4



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Li Q, Bian S, Hong J, Kawase-Koga Y, Zhu E, Zheng Y, Yang L, Sun T. Timing specific requirement of microRNA function is essential for embryonic and postnatal hippocampal development. *PLoS One*. 2011;6(10):e26000

[学会発表] (計 3 件)

①Yoko Kawase-Koga, et. al., Functional analysis of microRNAs in mouse cortical neural stem cells, International Society for Stem Cell Research, 2010. 6.16-19, San Francisco, CA, USA

②古賀陽子、他、下顎枝後方切開を用いた下顎骨関節突起骨折の治療経験、第 55 回 日本口腔外科学会総会・学術大会、2010.10.16-18、幕張メッセ、千葉

③古賀陽子、他、中枢神経系幹細胞における *Dicer* の役割 -プロテオミクスを用いての解析-、第 12 回日本再生医療学会総会、2013、3、21-23、パシフィコ横浜、横浜

④古賀陽子、他、中枢神経系の発育過程における *Dicer* の生物学的機能解析 -ニューロン新生とグリア新生-、第 12 回日本再生医療学会総会、2013、3、21-23、パシフィコ横浜、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀陽子 (KAWASE-KOGA YOKO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10392408

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 研究協力者

TAO SUN (TAO SU )  
Weill Medical College of Cornell University, Department of Cell and Developmental Biology, Associate Professor