

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462158

研究課題名(和文) マイクロRNA 21を用いた新たな脳梗塞治療薬の開発

研究課題名(英文) Effect of microRNA -21 in cerebral ischemia.

研究代表者

水川 克 (Mizukawa, Katsu)

神戸大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：80403260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルで、120分のtMCAO脳ではコントロール脳に比較して 1.28 ± 0.004 倍にmiR-21の発現が上昇しており、アポトーシスに対する抵抗性が増す可能性が示唆された。また、tMCAO脳では、コントロール脳に比べ、citrate, GABA, Glycerol, Glycineなどのアミノ酸やその他代謝物が有意に増加し、Glutamate, Ribrose-5P, Fructose-6P, Pyrvate, Glucoseが有意に低下しており、pentose phosphate pathway (PPP)経路が活性化していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the mouse brain of cerebral ischemia (120-min middle cerebral artery occlusion (MCAO)), microRNA 21 (miR-21) expression was significantly increased, although miR-21 was not increased in 30-min MCAO brain. next, we performed a comparative metabolic analysis of the effects of cerebral ischemia on the metabolism. Metabolic profiling by gas-chromatography/mass-spectrometry analysis showed clear separation between the ischemia and control group. citrate, GABA, Glycerol, and Glycine etc. were significantly increased in MCAO brain, on the other hand, Glutamate, Ribrose-5P, Fructose-6P, Pyrvate, Glucose, etc. were significantly decreased in MCAO brain. The decreases of fructose 6-phosphate and ribulose 5-phosphate suggested enhancement of the pentose phosphate pathway (PPP) during cerebral ischemia.

研究分野：脳梗塞

キーワード：cerebral infarction microRNA metabolome

1. 研究開始当初の背景

中高年で発症頻度が増す脳梗塞等の虚血性神経障害に対する治療法の開発は、高齢化を迎えた現代日本社会において、人々が豊かな生活を送るための重要な課題である。現在、脳梗塞の治療は、閉塞した血管を再開通させる治療法（血管内治療、血栓溶解療法）や抗血小板薬や抗凝固薬などによって血流の改善を促進させる治療が行われる。これまで、神経保護作用を有する薬剤は多数研究、開発されてきているが、脳梗塞の治療薬として実際に臨床的に応用されている薬剤は、フリーラジカルを抑制して神経保護作用を有するエダラボン以外は無い。したがって、新たな治療薬の開発が望まれている。

miR は、蛋白質をコードしない19~25塩基からなる小さな non-coding RNA である。ゲノムにコードされた miR は、標的のメッセンジャーRNA(mRNA)と部分相補的な配列を介して、翻訳阻害、分解等によって遺伝子発現制御を行っている。ヒトでは約1500もの miR が発見されており、約1/3の遺伝子が miR による遺伝子発現調節を受け、1つの miR が多くの遺伝子を標的とし、1個の miR で様々な変化を引き起こす可能性があるため、miR の治療への応用が期待されている。

脳梗塞や脳虚血時の miR の動態を解析した報告は少ない。Jeyaseelan らは SD ラットの中大脳動脈脳梗塞モデルで、miR の発現を網羅的に解析し、約100個の miR の変化を報告している。(Jeyaseelan, *Stroke*. 2008;39) Dharap らはラットの一過性の中大脳動脈閉塞モデルで、238個の miR のうち、8つの miR が上昇し、12個の miR が低下したと報告している (Dharap, *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29) また、Yin らはラットの一過性中大脳動脈閉塞モデルで用いた研究で miR-497 が Bcl-2 発現を促進させ、神経細胞死を抑制することを報告している。

(Yin, *Neurobiol Dis*. 2010;38(1):17-26) 更に、miR-1 や let-7f は IGF-1 シグナル経路に作用して、ラットの脳梗塞領域を有意に減少させたことが報告されている。(Selvamani, *PLoS One*, 7(2),2012) これらの報告は miR の発現が脳梗塞や脳虚血によって変化し、miR の一部は神経保護作用を有し、治療薬として有望であることを物語っている。

2. 研究の目的

申請者は、以前より主に脳腫瘍における miR の発現やその機能について解析してきた。グ

リオーマでは miR-21, miR-10b, miR-183 等が高発現している事を報告しており (Int J Cancer.;125(6):1407-13, 2009) miR-183 の機能についても研究してきたので (J Neurooncol. 2013 Feb;111(3):273-83) マイクロRNA の解析は熟知している。これまでの研究を基に miR-21 が神経細胞保護に寄与し、脳梗塞の新たな治療ターゲットと成りうるかを明らかにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1. ラット一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデルの作成

マウスを麻酔させた後、一側の頸動脈より intraluminal suture method にて一過性の中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデルを作製する。閉塞時間は30分、2時間などいくつかの群に分け、中大脳動脈の血流を Fiber optic probe を用いてモニターする。MCAO 後、経時的にラット脳を取り出し、正中で切り離し、MCAO 側と反対側の脳を別々に-80℃で保存する。

2. tMCAO での miR-21 の動態解析

上記で作製した脳梗塞ラット脳より Ambion mirVana™ miRNA isolation kit を用いて total RNA を抽出し、その後、TaqMan real-time PCR にて miR-21 の発現量を解析する。miR-21 の発現量は CT 法を用いて、コントロール (対側非脳梗塞脳) と比較した相対比を求める。また、miR-21 の in situ hybridization を行い、組織内での miR-21 の発現状態を観察する。

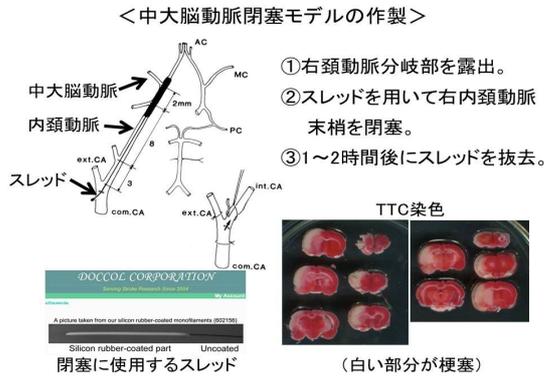
3. tMCAO でのメタボローム解析

上記で作製した脳梗塞ラット脳より組織抽出液を作成し、ガスクロマトグラフィー/質量分析器(GC/MS)にてメタボローム解析を行い、梗塞部での代謝変化を解析する。

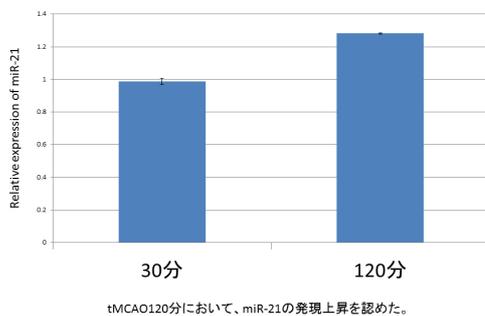
4. 研究成果

(1) tMCAO 脳における miR-21 の発現変化

一側の頸動脈より一過性の MCAO を起こし、30分後、2時間後の閉塞ののち大脳を半球を取り出し、miR-21 の発現について解析した。30分閉塞では、コントロール脳に比べて MCAO 脳では miR-21 の有意な変化は認めなかった。(正常脳 1.0 に対して、tMCAO 脳は 0.99 ± 0.019 倍)。しかし、120分の tMCAO 脳ではコントロール脳に比較して 1.28 ± 0.004 倍に miR-21 の発現が増加していた。このことから、一過性の脳梗塞時には miR-21 が上昇し、アポトーシスに対する抵抗性が増す可能性が示唆された。



tMCAO後のラット脳におけるmiR-21の発現
(対側正常脳との比較)



(2)

上記 tMCAO 脳を用いて、メタボローム解析を行った。

コントロール脳に比べ、30分の tMCAO 脳では Ethanolamine, citrate, GABA, Glycerol, Glycine, Hydroxybutyrate, Hypoxanthine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Phenylalanine, Tryptophan, Uracil, Valine などのアミノ酸やその他代謝物が有意に増加しており、120分の tMCAO 脳ではコントロール脳に比較して Ethanolamine, Glycerol, Glycine, Hydroxybutyrate, Hypoxanthine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Tryptophan, Uracil, Valine が有意に増加していた。

また Aspartate, Glutamate, Ribrose-5P, Fructose-6P, Pyruvate, Glucose は 30分、120分の tMCAO 脳で有意に低下していた。30分の tMCAO で有意に上昇していた Fumarate、Malate は 120分 tMCAO 脳では有意に低下しており、虚血により TCA サイクル内の代謝物は特異な変化を示した。

Glutamine の量は、tMCAO 脳ではほとんど変化を示さなかった。

以上の結果より、tMCAO 脳での代謝物の変化より、一過性の MCAO 脳ではグルコース代謝が抑制され、pentose phosphate pathway (PPP)経路が活性化していることが明らかとなった。

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 21 件)

1. Perioperative changes in cerebral perfusion territories assessed by arterial spin labeling magnetic resonance imaging are associated with postoperative increases in cerebral blood flow in patients with carotid stenosis. Yamamoto D, Hosoda K, Uchihashi Y, Fujita A, Sasayama T, Fujii M, Sugimura K, Kohta M, Kohmura E. *World Neurosurg.* 2017 Mar 16. pii: S1878-8750(17)30349-2. (査読あり)
2. Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia. Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Yamamoto Y, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E. *Neuroscience.* 2017 May 4;349:1-16 (査読あり)
3. Genome-wide DNA methylation profiling identifies primary central nervous system lymphoma as a distinct entity different from systemic diffuse large B-cell lymphoma. Nakamura T, Yamashita S, Fukumura K, Nakabayashi J, Tanaka K, Tamura K, Tateishi K, Kinoshita M, Fukushima S, Takami H, Fukuoka K, Yamazaki K, Matsushita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Kubo A, Shuto T, Kocialkowski S, Yamanaka S, Mukasa A, Sasayama T, Mishima K, Maehara T, Kawahara N, Nagane M, Narita Y, Mano H, Ushijima T, Ichimura K. *Acta Neuropathol.* 2017 Feb;133(2):321-324.
4. Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Sato N, Takeuchi Y, Kyotani K, Mukasa A, Mizukawa K, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E. *Neuro Oncol.* 2016 May 5. pii: now090. (査読あり)
5. Rapid tumor growth with glial differentiation of central neurocytoma after stereotactic radiosurgery. Tanaka H, Sasayama T, Yamashita H, Hara Y, Hayashi S, Yamamoto Y, Fujita Y, Okino T, Mizowaki T, Yamaguchi Y,

- Tanaka K, Kohmura E. *J Clin Neurosci*. 2016 Sep;31:188-92. doi: 10.1016/j.jocn.2016.01.036. (査読あり)
6. Duplex-assisted carotid artery stenting without administration of contrast medium for patients with chronic kidney disease or allergic reaction. Mizowaki T, Fujita A, Imahori T, Uyama A, Inoue S, Kohta M, Hamaguchi H, Sasayama T, Hosoda K, Kohmura E. *Neuroradiology*. 2016 Jul;58(7):679-86. doi: 10.1007/s00234-016-1678-x. (査読あり)
 7. Radiotherapy for brainstem gliomas in children and adults: A single-institution experience and literature review. Yoshida K, Sulaiman NS, Miyawaki D, Ejima Y, Nishimura H, Ishihara T, Matsuo Y, Nishikawa R, Sasayama T, Hayakawa A, Kohmura E, Sasaki R. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2016 Mar 3. doi: 10.1111/ajco.12451 (査読あり)
 8. Radiographic occult cerebellar germinoma presenting with progressive ataxia and cranial nerve palsy. Minami N, Tanaka K, Kimura H, Hirose T, Mori T, Maeyama M, Sekiya H, Uenaka T, Nakamizo S, Nagashima H, Mizukawa K, Itoh T, Sasayama T, Kohmura E. *BMC Neurol*. 2016 Jan 12;16:4. doi: 10.1186/s12883-015-0516-9. (査読あり)
 9. Coexistence of acromegaly with dural arteriovenous fistula of the cavernous sinus. Tanaka J, Fujita A, Kohta M, Hosoda K, Kohmura E. *Neuroradiology*. 2016 Aug;58(8):839-40. doi: 10.1007/s00234-016-1698-6. (査読あり)
 10. Endoscopic endonasal translacerum approach to the inferior petrous apex. Taniguchi M, Akutsu N, Mizukawa K, Kohta M, Kimura H, Kohmura E. *J Neurosurg*. 2016 Apr;124(4):1032-8. doi: 10.3171/2015.1.JNS142526.
 11. Tumor-associated macrophages associate with cerebrospinal fluid interleukin-10 and survival in primary central nervous system lymphoma (PCNSL). Sasayama T, Tanaka K, Mizowaki T, Nagashima H, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *Brain Pathol*. 2015 ;26(4):479-87. doi: 10.1111/bpa.12318 (査読あり)
 12. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y, Masui K, Gini B, Yang H, Hosoda K, Sasaki R, Mischel PS, Kohmura E. *J Clin Invest*. 2015 Apr;125(4):1591-602. doi: 10.1172/JCI78239. Epub 2015 Mar 23. (査読あり)
 13. Combined IDH1 mutation & MGMT methylation status on long-term survival of patients with cerebral low-grade glioma, Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, Takata K, Nor Shazrina Sulaiman, Nishihara M, Kohta M, Sasaki R, Hirose T, Itoh T, and Kohmura E *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2015;138:37-44. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.07.019 (査読あり)
 14. STAT3 activation is associated with cerebrospinal fluid interleukin-10 (IL-10) in primary central nervous system diffuse large B cell lymphoma. Mizowaki T, Sasayama T, Tanaka K, Mizukawa K, Takata K, Nakamizo S, Tanaka H, Nagashima H, Nishihara M, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *J Neurooncol*. 2015 ;124(2):165-74. doi: 10.1007/s11060-015-1843-9. (査読あり)
 15. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, Matsushita Y, Tamura K, Kinoshita M, Tanaka K, Fukushima S, Takami H, Arita H, Kubo A, Shuto T, Ohno M, Miyakita Y, Kocialkowski S, Sasayama T, Hashimoto N, Maehara T, Shibui S, Ushijima T, Kawahara N, Narita Y, Ichimura K. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 ;42(3):279-90. doi: 10.1111/nan.12259. (査読あり)
 16. Targeting glutaminase and mTOR.. Tanaka K, Sasayama T, Kohmura E. *Oncotarget*. ;6(29):26544-5. doi: 10.18632/oncotarget.5263. (査読あり)
 17. Minimum Transpetrosal Retrolabyrinthine Approach for Revascularization of Posterior Cerebral Artery: Operative Nuance. Kimura H, Taniguchi M, Koyama J, Fujimoto Y, Hosoda K, Kohmura E. *Operative Neurosurgery* (in press). (査読あり)
 18. Different spatial distribution between germinal center B and non-germinal center B primary central nervous system

- lymphoma revealed by magnetic resonance group analysis. Kinoshita M, Sasayama T, Narita Y, Yamashita F, Kawaguchi A, Chiba Y, Kagawa N, Tanaka K, Kohmura E, Arita H, Okita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Hashimoto N, Yoshimine T. *Neuro Oncol.* 2014 May;16(5):728-34. (査読あり)
19. Two cases of cerebral infarction due to focal irradiation for glioma in adults, Minami N, Mizukawa K, Iwahashi H, Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Hosoda K, Mukumoto N, Sasaki R, Kohmura E. *No Shinkei Geka.* 2015 Apr;43(4):344-51. (査読あり)
20. A 40-Year-Old Female with Leptomeningeal Lesions. Mizowaki T, Sasayama T, Semba S, Sasaki R, Yasuo K, Nakamizo S, Tanaka K, Mizukawa K, Uchihashi Y, Kohmura E. *Brain Pathol.* 2015 Jul;25(4):509-10. (査読あり)
21. Hypothalamic-pituitary germinoma presenting as generalized hypohidrosis. Fukunaga A, Tajima S, Sasayama T, Tanaka K, Takahashi Y, Nishigori C. *Eur J Dermatol.* 2017 Feb 15. doi: 10.1684/ejd.2017 (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 水川 克、森下 暁二、三宅 茂、近藤 威、篠山 隆司、甲村 英二
脳性麻痺・脳性小児麻痺に対するバクロフェン髄注療法について
第 55 回日本定位・機能神経外科学会
2016.01.22~23 (仙台)
- (2) 水川 克
当施設でのパーキンソン病に対する脳深部刺激療法
日本脳神経外科学会 第 75 回学術総会
2016.09.29~10.01 (福岡)
- (3) 甲田 将章、篠山 隆司、長島 宏明、前山 昌博、水川 克、甲村 英二
グリオーマ手術における術中 MRS の有用性に関する検討
日本脳神経外科学会 第 75 回学術総会
2016.09.29~10.01 (福岡)
- (4) 坂田 純一、篠山 隆司、田中 一寛、中田 光俊、橋本 直哉、木下 学、香川 尚己、水川 克、長嶋 宏明、佐藤 直子、甲村 英二
膠芽種における stanniocalcin-1 の発現解析
第 17 回日本分子脳神経外科学会
2016.08.26~27 (東京)
- (5) 水川 克¹、三宅 茂²、長嶋 宏明¹、堀達雄¹、森達也¹、山本祐輔¹、高石吉将³、甲村 英二¹
当施設における脊髄空洞症の治療経験

- 第 30 回日本脊髄外科学会
2015.6.25-26 (札幌)
- (6) 水川 克¹、藤本陽介¹、坂田純一¹、甲田将章¹、森下暁二²、三宅茂³、近藤威¹、甲村英二¹
当施設でのバクロフェン髄注療法について
日本脳神経外科学会第 74 回学術総会
2015.10.14-16 (札幌)
- (7) 水川 克、森下暁二、三宅 茂、近藤威、篠山隆司、甲村英二
脳性麻痺・脳性小児麻痺に対するバクロフェン髄注療法について
第 55 回日本定位・機能神経外科学会
2015.1.22-23 (仙台)
- (8) 長嶋宏明、水川 克、山本祐輔、谷口理章、甲村英二
Gorham 症候群合併のキアリ奇形 1 型：脊髄空洞症の急性増悪を認めた 1 例
第 30 回日本脊髄外科学会
2015.6.25-26 (札幌)
- (9) 水川 克、篠山隆司、田中一寛、長嶋宏明、堀達雄、細田弘吉、甲村英二
当院における悪性神経膠腫再発例に対するアバスタチン(Bevacizumab)療法
日本脳神経外科学会第 73 回学術総会
2014.10.9-11 (東京)
- (10) 水川 克、田中一寛、篠山隆司、細田弘吉、甲村英二
脱髄疾患を合併する Castleman 症候群を呈した Chordoid meningioma の 1 例
第 32 回日本脳腫瘍病理学会
2014.5.23-24 (徳島)
- (11) 水川 克、堀 達雄、森 達也、鷗山 淳、南 徳明、長嶋宏明、田中一寛、篠山隆司、細田弘吉、甲村英二
脳内出血を来たした滑膜肉腫の脳転移の 1 例
第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会
2014.11.30-12.2 (東京)

〔図書〕(計 6 件)

22. [分担執筆] Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Katsu Mizukawa, Masamitsu Nishihara, and Eiji Kohmura, Cerebrospinal Fluid Interleukin-10 (IL-10) as a Diagnostic Marker in Primary Central Nervous System Lymphoma., Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes. Editor: Ryuya Yamanaka, NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC., 2016
23. [分担執筆] Takashi Sasayama*, Kazuhiro Tanaka, Eiji Kohmura, THE ROLES OF MICRORNAs IN GLIOBLASTOMA BIOLOGY AND BIOMARKER, NEUROONCOLOGY

NEWER DEVELOPMENT, Edited by
Amit Agrawal, p27~66, INTECH OPEN
SCIENCE, 2016.

24. [分担執筆] 細田弘吉、脳卒中各病態
における脳循環代謝画像の意義、頸動
脈内膜剥離術における脳循環代謝
画像の意義、脳卒中における脳循環
代謝画像のすべて The Mt.Fuji
Workshop on DVD(0289-8438) 33巻
25. [分担執筆] 細田弘吉、脳出血各論
小脳出血 小脳出血の治療(解説/特
集)、最新臨床脳卒中学(下)-最新
の診断と治療-日本臨床, 2014,
p381-384
26. [分担執筆] 細田弘吉、虚血性脳血管
障害急性期の全身管理、脳血管障害の
急性期マネジメント、文光堂、2014,
p121-126.
27. [分担執筆] 篠山隆司、髄膜の腫瘍 髄
膜肉腫症 p303-3-306、新領域別症候
群シリーズ No.28 神経症候群(第2
版)III、日本臨床, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

水川克 (MIZUKAWA Katsu)
神戸大学, 医学(系)研究科(研究院)
非常勤講師
研究者番号: 80403260

(2)研究分担者

篠山隆司 (SASAYAMA Takashi)
神戸大学, 医学部附属病院, 講師
研究者番号: 10379399

田中一寛 (TANAKA Kazuhiro)
神戸大学, 医学(系)研究科(研究院), 研究員
研究者番号: 70467661

細田弘吉 (HOSODA Kohkichi)
神戸大学, 医学(系)研究科(研究院), 准教授
研究者番号: 90403261

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者: なし