

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08444

研究課題名(和文) microRNAを介したユビキチンリガーゼの機能制御解析と脳機能障害治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNA regulating ubiquitin ligase and its component, and the application of microRNA to the treatment of brain dysfunction

研究代表者

大村 友博 (OMURA, TOMOHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00439035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)等の神経疾患では、運動機能を客観的に評価することが難しく、治療も対症療法しか無いのが現状である。申請者はPDに關与する分子としてHRD1/SEL1Lについて研究を行ってきたが、近年microRNAがmRNAの発現を制御する可能性が示唆されている。そこでPDモデルを用い、HRD1/SEL1Lの発現を制御するmicroRNAを探索した。その結果、申請者はSEL1Lを制御するmicroRNAを見出し、このmicroRNAがPDモデルの細胞死に影響を与えることが判明した。以上、このmicroRNAがSEL1Lの発現制御を介したPDの新たな薬物治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD治療はいずれも対症療法であり根本的治療法ではない。microRNAを介した治療法(薬)は、多様な薬物が臨床応用されているこれら神経疾患でも存在しない。本成果を応用させることで、新規作用機序に基づく治療方法の基礎となり得る可能性も提示できると考えられる。

また、神経疾患の治療は運動障害等が表出する前に行うほうが有効であると考えられている。microRNAを測定することで運動機能を客観的に評価・診断することが可能となれば、臨床現場においてきわめて有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In neurological diseases such as Parkinson's disease (PD), it is difficult to assess motor function objectively, and symptomatic therapy is the only treatment at present. I have been investigating HRD1/SEL1L complex as key molecules involved in PD, and microRNAs have recently been suggested to regulate the expression of various target mRNAs and involve the onset of diverse diseases. Therefore, using PD model cells, we searched for microRNAs that regulate the expression of HRD1/SEL1L using microRNA databases. We extracted microRNA that regulates SEL1L and this microRNA also affects cell death in PD models. Taken together, these results suggest that this microRNA may be a novel pharmacotherapeutic target for PD via regulation of SEL1L expression.

研究分野：神経化学、医療薬学

キーワード：パーキンソン病 microRNA ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

病棟業務において、認知機能や運動機能が低下していると思われる患者と遭遇することは多く、特に高齢者では老人性痴呆（認知症）や運動障害等の神経疾患を罹患している場合がある。これら神経疾患の診断・評価法として、画像診断や問診・日常生活動作による評価法があるが、認知機能や運動機能を客観的に評価することは難しい。これらの疾患の治療では、病勢の進行を遅らせる対症療法が主であり根治は難しい。また、これらの病態が混在する患者も存在し、薬物治療で難渋するケースが多い。これらの神経疾患の発症には、酸化ストレスや遺伝的素因など多くの要因が絡んでいるが、近年その発症原因の一つに小胞体ストレス誘発による神経細胞死が提唱されている。

小胞体機能を低下させるストレスが細胞に負荷されると、正常な蛋白質合成が行われず、代わりに変性蛋白質が細胞内に蓄積してしまう。この状態を小胞体ストレスと呼び、この状態が長時間続くと細胞はアポトーシスを起こして死に至る。このとき、細胞は変性蛋白質の蓄積によって起こる細胞死に対抗するため様々な防御機構を発動させるが、その一つが小胞体膜内外に存在するユビキチンリガーゼの活性化により変性蛋白質を分解除去する機構（小胞体関連分解）である。

申請者はこれまでユビキチンリガーゼ HRD1 と神経疾患、特に認知障害と運動障害との関連性について研究を行ってきた。申請者は HRD1 が脳内で認知や運動に関与する部位の神経細胞に発現していること、そして HRD1 が家族性パーキンソン病原因蛋白質の一つを分解し、その蓄積によって起こる細胞死を抑制すること、そしてパーキンソン病モデルにおいて HRD1 安定化因子として知られる SEL1L の発現を抑制すると、HRD1 の発現量が低下し、それに伴い細胞死が増強することを見出している。一方、近年神経疾患と microRNA (miRNA) との関連性が報告されているが、中でも microRNA-155 (miR-155) はパーキンソン病等の神経疾患に関与する重要な miRNA として報告されている。さらに SEL1L の発現を制御することが報告されていることから、miR-155 は SEL1L の発現制御を介し、HRD1 のユビキチンリガーゼ活性をコントロールしている可能性がある。

これらの知見より、脳機能障害において miR-155 を介した HRD1-SEL1L 複合体の発現量低下に伴い、HRD1 のユビキチンリガーゼ活性が低下し、変性蛋白質が蓄積して ER ストレスを誘発し、細胞死を惹起して認知・運動障害を引き起こすのではないかと考えた。そこでこれまでの成果を発展させ、miR-155 をはじめとする miRNA による HRD1 等のユビキチンリガーゼの機能制御メカニズムを解析することで、新たな脳機能障害治療法を提示することが可能ではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

以下の研究を通して、miR-155 をはじめとする miRNA が HRD1-SEL1L の発現を制御するか検討し、脳機能障害モデルにおいて miRNA が細胞保護効果を示すか、さらに運動機能を評価する指標となり得るか検討した。

- (1) パーキンソン病モデル細胞を作出し、小胞体ストレスが起きているかどうか検討する。また、HRD1 および HRD1 の安定化分子と考えられる SEL1L が誘導されるか否か検討する。
- (2) miRNA データベースを用いて、SEL1L の発現を制御する miRNA を同定する。
- (3) miR-155 及び(2)で同定した miRNA が、SEL1L の発現を制御するか否か検討し、細胞死に影響を与えるか検討する。

3. 研究の方法

- (1) ドパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を添加することでパーキンソン病モデル細胞を作出した。その後 GRP78、94 などの小胞体ストレス関連分子の誘導について、qRT-PCR 法やウエスタンブロット法などを用いて検討した。合わせて HRD1 および SEL1L の発現量についても検討した。
- (2) 複数の miRNA データベースを用い、SEL1L を標的とする miRNA を抽出した。
- (3) PD モデル細胞において、SEL1L の発現量と抽出された miRNA の発現量との関連を qRT-PCR 法を用いて検討した。そして、miRNA の mimic または inhibitor を遺伝子導入した細胞に 6-OHDA を曝露し、SEL1L の発現量が変化するかウエスタンブロット法を用いて検討するとともに、細胞生存率を MTT 法で検討した。

4. 研究成果

- (1) PD モデル細胞における HRD1 および SEL1L の関与

PD モデル細胞を作出し、GRP78、94 などの小胞体ストレス関連分子の誘導を qRT-PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて確認した。そのうえで、HRD1 及び SEL1L の mRNA が誘導されていることを確認した。

PD モデル細胞において、HRD1 または SEL1L を発現抑制すると細胞死が増強することを確認したが、HRD1 よりも SEL1L を発現抑制したほうがより PD モデル細胞における細胞死を増強することを見出し、SEL1L の制御がより細胞の生死に影響を与える可能性が示唆された。

(2) SEL1L を制御する miRNA の探索

SEL1L を成業する miRNA として既報で報告されていた miR-155 について、PD モデル細胞を用いて検討を行ったところ、有意な変化は認められなかった。

複数の miRNA データベースを用いて、SEL1L を発現制御する microRNA を探索したところ、複数の microRNA を見出した。その後、PD モデル細胞を用いて詳細に検討したところ、miR-101 を候補として抽出した。この miRNA は、PD モデル細胞において SEL1L の mRNA 発現量と逆相関することが確認され、mimic を遺伝子導入すると、PD モデル細胞における SEL1L の発現量上昇は抑制され、細胞死が増強された。そして inhibitor を遺伝子導入すると、その反応は抑制された。以上より、この microRNA は SEL1L の発現を制御する miRNA であり、PD 治療における新たなターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Omura T, Matsuda H, Nomura L, Imai S, Denda M, Nakagawa S, Yonezawa A, Nakagawa T, Yano I, Matsubara K.	4. 巻 506
2. 論文標題 Ubiquitin ligase HMG-CoA reductase degradation 1 (HRD1) prevents cell death in a cellular model of Parkinson's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 516-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.094.	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 Omura T, Sasaoka M, Hashimoto G, Imai S, Yamamoto J, Sato Y, Nakagawa S, Yonezawa A, Nakagawa T, Yano I, Tasaki Y, Matsubara K.	4. 巻 503
2. 論文標題 Oxicam-derived non-steroidal anti-inflammatory drugs suppress 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cell death via repression of endoplasmic reticulum stress response and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2963-2969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.08.078.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Omura T, Matsuda H, Nomura L, Naito M, Nakagawa S, Imai S, Yonezawa A, Nakagawa T, Matsubara K.
2. 発表標題 Role of ubiquitin ligase HRD1 in a cellular model of Parkinson's disease
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本凱朝、大村友博、笹岡美和、大谷祐基、中川俊作、今井哲司、米澤 淳、中川貴之、田崎嘉一、松原和夫
2. 発表標題 MPP+誘発神経細胞死に対するメロキシカムの神経保護作用とミトコンドリア障害及び小胞体ストレスの関与
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Omura T, Sasaoka M, Hashimoto G, Imai S, Yamamoto J, Sato Y, Nakagawa S, Yonezawa A, Nakagawa T, Tasaki Y, Yano I, Matsubara K.
2. 発表標題 Oxicam-derived non-steroidal anti-inflammatory drugs protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cell death by suppressing of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村月渚、大村友博、今井哲司、中川俊作、米澤淳、中川貴之、佐藤夕紀、松原和夫
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼHRD1の安定化因子SEL1Lを標的とするmicroRNAの探索
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019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