

平成30年6月12日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10296

研究課題名(和文) microRNAを標的とした新たな脳虚血の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) The roles of miRNAs in ischemic preconditioning

研究代表者

木内 博之 (KINOCHI, Hiroyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：30241623

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)：microRNA(miRNA)は蛋白質をコードしない小型一本鎖RNAであり、標的mRNAの翻訳中断あるいは遺伝子自体の分解を介し、遺伝子発現を制御している。一方、非致死的な短時間の虚血負荷により誘導される虚血耐性現象には、多くの遺伝子発現変化が関与するとされるが、そのメカニズムは解明されていない。本研究では虚血性神経傷害と虚血耐性現象におけるmiRNAの役割をラットおよびPC12細胞を用いて検討した。その結果、耐性獲得脳では一部のmiRNA発現に変化を認めた。今後更なる検討を要するものの、虚血耐性獲得にmiRNAの発現変化が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：microRNAs (miRNAs) are a class of small, non-coding RNAs which mediate post-transcriptional regulation of gene expression. On the other hand, ischemic preconditioning involves numerous gene expression changes; however, its mechanism is still obscure. In this study, we evaluated the roles of miRNAs in ischemic preconditioning using rats and PC12 cells. Our results show that the expressions of a part of miRNAs were modified in the preconditioned brains or cells although further studies are necessary to clarify the relationship between miRNAs and gene expression changes.

研究分野：脳神経外科

キーワード：虚血性神経細胞障害 虚血耐性 microRNA 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

蛋白質生成に関与しないノンコーディング RNA の一つである miRNA は、18-25 塩基長の小型 RNA である。これは、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボ核酸との複合体形成により標的 mRNA の相補的配列部位を認識し、そこへの結合後、遺伝子翻訳の阻害や、遺伝子自体の分解などを介し、遺伝子発現を負に調節すると考えられている。その特徴として、標的結合部位の配列は必ずしも一致する必要がないため一つの miRNA が複数の mRNA 発現を調節する点が挙げられる。そのため、60%以上の遺伝子産物が miRNA による制御を受けると予測されている。

これまで、発生、分化、恒常性の維持などの生命現象の主体をなす蛋白質発現を制御する経路として、情報伝達系、細胞増殖因子、サイトカインなどの重要性が解明されてきたが、この miRNA は「ファインチューナー」として遺伝子発現量を制御し、同様にあるいはそれ以上に重要な細胞機能を担っていることが徐々に解明されている。それと同時に、この精巧なシステムの破綻は、様々な細胞機能の傷害を惹起することも明らかになってきており、実際、miRNA が癌、ウイルス性疾患、動脈硬化などをはじめとする多くの病態に関与することが報告されている。中枢神経系においても miRNA が発生過程のみならず、学習や記憶などの高次機能を miRNA が制御していることに加え、さらにアルツハイマー病をはじめとする難治性の神経変性疾患の発症にも深く関与していることが報告されている。

一方、脳梗塞は、脳動脈の閉塞の結果生じる神経系細胞の死であり、その発生は、血流低下の程度と継続時間により規定される。主幹動脈の閉塞による局所脳虚血は、急激なエネルギー傷害により早期に壊死に陥る。しかし、虚血周辺部の血流低下が比較的軽度な部位や、短時間で血流が再開された場合には、急激な細胞死は免れるものの、アポトーシスを主とした細胞傷害により徐々に細胞死に陥る。また、短時間でも全脳に急激な血流低下が生ずると、数日後に海馬などに遅発性神経細胞死を起こす。そのため、主に治療対象となるのは、これら比較的タイムウィンドウが広い部位であり、脳梗塞治療戦略上、最大の貢献をもたらすと考えられる。遅発性細胞死の主な傷害機序はアポトーシスであるが、その過程ではアポトーシス関連蛋白質、転写因子、サイトカインなどの多数の遺伝子が発現され、この発現制御に miRNA が深く関わっている可能性が示唆されている。従って、虚血性神経細胞傷害においても miRNA が重要な役割を担うことが予想され、実際、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける網羅的 miRNA 解析では、虚血後に miR-140、miR-145 および miR-331 が誘導されることが報告されている。しかしながら、これらの miRNA 発現がどのよ

うに虚血後の細胞傷害を制御しているかは全く解明されていない。

また、虚血耐性現象は生来備わっている強力な保護機構であり、これを誘導することは虚血のみならず様々な侵襲傷害に対する治療の観点から注目されている。その獲得機序はいまだ解明されていないが、遺伝子発現変化を介した種々の活性経路が関与すると考えられている。この遺伝子発現調節においても miRNA が重要な役割を担っていることが示唆され、現在のところ、マウス中大脳動脈閉塞による虚血耐性モデルを用いた網羅的解析では miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429、miR-182、miR-183、および miR-96 の発現亢進が示されている。

このように虚血脳や虚血耐性獲得脳での miRNA の発現動態が網羅的に解析され始めたものの、詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

miRNA は虚血性神経細胞傷害や虚血耐性獲得の制御において重要な鍵を握り、この分子機構の解明が画期的な脳梗塞治療薬の開発へ繋がるものと期待される。さらに治療の観点より、miRNA が元来細胞内に存在するため投与に伴う免疫反応などの副作用がおり難いことや、miRNA が複数の遺伝子の発現レベルを調節していることが利点として挙げられる。

そこで本研究では、脳虚血病態と虚血耐性獲得における miRNA の発現動態と役割を解析する。これにより、虚血性神経傷害を促進的もしくは保護的に働く miRNA を同定し、これら miRNA の阻害あるいは補充による新たな虚血性神経細胞傷害治療の開発の礎となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) In vivo 脳虚血モデル (一過性前脳虚血モデル)

雄性 SD ラット (250 ~ 320g) を用い、虚血モデルには一過性前脳虚血モデル (Smith モデル) を使用した。脱血により平均動脈血圧を 30-35 mmHg に低下させた状態で両側総頸動脈を遮断し、前脳虚血を作成した。非致命的虚血群では 3 分間、致命的虚血群では 5 分間の総頸動脈遮断を行った。虚血耐性群では、3 分間の非致命的虚血による preconditioning 48 時間後に 5 分間の総頸動脈遮断を施行した。虚血性細胞傷害は TUNEL 染色で解析した。

(2) In vitro 虚血モデル

培養 PC12 細胞を使用した。培養細胞に対する疑似虚血条件としては、低酸素低グルコース条件 (oxygen glucose deprivation: OGD)

を使用した。非致死的虚血群では6時間、致死的虚血群では15時間のOGDを负荷した。虚血耐性群では、6時間の非致死的虚血によるpreconditioning 48時間後に15時間のOGDを施行した。細胞傷害の程度はLDH assayで解析した。

(3) DNA アレイ解析

致死的虚血群、非致死的虚血群、虚血耐性群のin vivoサンプルを検討した。最終虚血48時間後に海馬CA1領域を抽出した。サンプルからcDNAを合成した後、発現解析アレイにハイブリダイゼーションし、マイクロアレイスキャナーを用いて発現解析した。発現量はshamとの比較により検討した。

(4) miRNAの発現解析

致死的虚血群、非致死的虚血群、虚血耐性群のin vivoとin vitroの両者のサンプルを検討した。In vivoサンプルでは、虚血後1、4、8、24、48時間で海馬CA1領域を抽出した。cDNAサンプルをQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen社)と混合した後、目的とするmiRNA(miR-132、miR-184、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141)のprimerと反応させた。SYBR Greenシステム(タカラバイオ社)にてPCR産物の定量測定を行った。in vitroのサンプルは非致死的な6時間のOGD後、1、4、8、24、48時間にサンプリングした。In vivoと同様の処置を行い、miRNA(miR-132、miR-184、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141)のprimerと反応させ、解析した。

4. 研究成果

(1) 脳虚血耐性の獲得

In vivo モデル

5分間の致死的脳虚血群では、虚血3日後より海馬CA1で神経細胞死が出現し、5日後には91%の神経細胞が脱落した。3分間の虚血負荷では遅発性神経細胞死は生じなかった。この3分間の非致死的虚血をpreconditioningとし、48時間後に5分間の致死的虚血を负荷すると虚血に対する耐性が獲得され、CA1神経細胞死は15%に抑制された($P < 0.01$)。

In vitro モデル

15時間の致死的OGD群では、培養液内へ漏出するLDHはsham群に比べ約25倍に上昇した。6時間のOGD負荷では漏出したLDH値はsham群と変化を認めなかった。この6時間の非致死的OGDをpreconditioningとし、48時間後に5分間の致死的OGDを负荷すると耐性が獲得され、培養液へ漏出したLDH値は、致死的OGD群の約70%に抑制された($P < 0.01$)。

(2) DNA アレイ解析

miRNAの発現解析に先んじ、虚血脳および虚血耐性獲得脳での遺伝子発現変化をin vivo虚血モデルで確認した。3分間の非致死的脳虚血2日後には、4つの遺伝子(代謝関連2、構造蛋白質関連1、不明1)に発現変化を認めたのみであった。一方、5分間の致死的脳虚血2日後には、計192の遺伝子に発現変化を認め、これらは主にcell cycle関連遺伝子、apoptosis関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子などだった。虚血耐性獲得群では、致死的虚血で誘導されたcell cycle関連遺伝子、apoptosis関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子の誘導が著明に抑制された。

(3) miRNAの発現変化

In vivoモデルを用いた検討では、非致死的虚血後4および8時間でmiR-184とmiR-132発現の亢進を認め、miR-200a、miR-200b、miR-200cおよびmiR-141の発現は、虚血後の明らかな変化を認めなかった。非致死的虚血群のサンプルでは、miR-132、miR-184、miR-200a、miR-200b、miR-200cおよびmiR-141の発現に明らかな変化は認めなかった。虚血耐性群では、最終虚血後8時間でmiR-184の発現が亢進している傾向を認めた。

In vitroモデルでの検討でも同様の傾向を認め、非致死的虚血後4時間で、miR-184の発現が亢進する傾向を認めた。miR-132、miR-200a、miR-200b、miR-200cおよびmiR-141の発現は、明らかな変化を認めなかった。

以上より、虚血耐性の獲得には、一部のmiRNA、特にmiR-184が重要な役割を担っている可能性があり、これがcell cycle関連遺伝子、apoptosis関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子の発現を調節している可能性が推測された。

カイニン酸を用いたマウス痙攣誘発モデルでは、短時間痙攣によりmiR-184の発現が亢進し、これが長時間痙攣に伴う神経細胞傷害に対する耐性獲得現象に寄与することが報告されている(McKiernan et al, Exp Neurol 2012)。miR-184の標的蛋白質は、十分には解明されていないが、近年、細胞生存シグナルに関与するAkt2が一つの候補として挙げられている(Foley NH, Cancer 2010)。しかしながら、本検討で行ったDNAアレイ解析では、虚血耐性獲得脳で発現変化した遺伝子にAkt2は含まれておらず、miR-184による虚血耐性獲得メカニズムの解明には今後の更なる検討が必要である。また、miR-184の虚血耐性獲得における役割を明確にするために、今後は本miRNAのmimicもしくはアンチセンスmiRNAの投与実験を行う予定である。

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)

Wakai T, Narasimhan P, Sakata H, Wang E, Yoshioka H, Kinouchi H, Chan PH.: Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice. J Cereb Blood Flow Metab 36: 2134-2145, 2016 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

2017年8月25日 第18回日本分子脳神経外科学会(甲府) The roles of HAX-1 in ischemic neuronal injury. 隋欣、吉岡秀幸、金丸和也、八木貴、橋本幸治、館岡達、福田憲人、木内博之

2017年4月1日 Brain 2019 (Berlin) Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice. Fukuda N, Wakai T, Yoshioka H, Chan PH, Kinouchi H

2017年4月1日 Brain 2019 (Berlin) The roles of HAX-1 in ischemic neuronal injury. Xin S, Yoshioka H, Yagi T, Kanemaru K, Kinouchi H

2016年11月13日 4th Symposium on Conditioning Strategies for Neurological Disorders (Suzhou) Preconditioning in stem cell transplantation therapy for stroke. Kinouchi H, Wakai T, Yoshioka H, Chan PH.

2016年11月11日 第59回日本脳循環代謝学会学術集会(徳島) 虚血性神経細胞障害における Hax-1 の役割. 隋欣、吉岡秀幸、金丸和也、八木貴、橋本幸治、館岡達、福田憲人、木内博之

2016年8月27日 第17回日本分子脳神経外科学会(東京) マウス脳出血モデルに対する hypoxic preconditioning を併用した神経幹細胞移植治療の効果. 若井卓馬、吉岡秀幸、八木貴、館岡達、福田憲人、金丸和也、Chan PH、木内博之

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 博之 (KINOUCHI, Hiroyuki)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：30241623

(2) 研究分担者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：20402076

若井 卓馬 (WAKAI, Takuma)
山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員
研究者番号：30456446