

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15009

研究課題名(和文) 虚血応答因子としての脳由来胆汁酸の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological significance of brain-derived bile acids as ischemic response factors.

研究代表者

大江 総一(OE, Souichi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70599331

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)：本研究では、まずマウス脳梗塞モデルを用い梗塞領域において胆汁酸存在量が上昇することを見出した。これを「脳由来胆汁酸」と捉え、脳梗塞領域における合成メカニズムと生理機能を明らかにした。その結果、胆汁酸合成律速酵素であるCYP7A1が神経細胞に発現し脳梗塞時に発現上昇する事を明らかにした。また、胆汁酸合成関連酵素であるHSD3B7の発現も上昇する事、RNA結合タンパク質であるAUF1がCYP7A1 mRNA安定性に関わる事等を明らかにした。さらに胆汁酸合成不全マウスとしてCyp7a1ノックアウトマウスを作製しin vivo解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は脳血管機能の破綻に起因する代表的な疾患であり、血栓溶解療法や脳保護療法が用いられているがより積極的に脳梗塞病態を改善する方法が求められる。報告者らは脳梗塞モデルマウスにおいて脳梗塞領域のニューロンで「胆汁酸」合成が上昇するという新事実を見出し、新規脳梗塞治療法確立を目指した研究をおこなった。本研究により、神経細胞においてCYP7A1が発現する事、脳梗塞環境下でCYP7A1の発現が上昇する事、RNA結合タンパク質であるAUF1がその発現変化に関わる事等が明らかとなった。これまで着目されていなかった脳での胆汁酸機能の一端を解明した研究結果であり脳梗塞研究のさらなる発展に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first found that bile acid levels were elevated in the infarcted region using a middle cerebral artery occlusion model in mice. We considered the emergence of bile acids as "brain-derived bile acids" and investigated the synthesis mechanism and physiological function of bile acids in the infarcted region. We found that CYP7A1, the rate-limiting enzyme for bile acid synthesis, is expressed in neurons and is upregulated in the infarct region. We also found that HSD3B7, an enzyme related to bile acid synthesis, is also upregulated, and that AUF1, an RNA-binding protein, is involved in CYP7A1 mRNA stability control. In addition, we generated Cyp7a1 knockout mice, which are deficient in bile acid synthesis, and performed in vivo analyses.

研究分野：中枢神経系、脳梗塞、遺伝子発現制御

キーワード：脳梗塞 MCAO 胆汁酸 CYP7A1 RNA安定性 AUF1

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は脳血管機能の破綻に起因する代表的な疾患であり、現在日本国内における死因の第4位を占めている。その治療法としては血栓溶解療法や脳保護療法が用いられているが、より積極的に脳梗塞病態を改善する方法が求められる。報告者らは脳梗塞モデルマウスにおいて脳梗塞領域のニューロンで「胆汁酸」合成が上昇するという新事実を見出し、「なぜ梗塞領域で胆汁酸合成が必要なのか？」という問いの答えを得るため、合成亢進メカニズムの解明、作用標的・作用機序の解明、に焦点をあて新規脳梗塞治療法確立を目指した研究をおこなった。

胆汁酸は胆汁に含まれる両親和性ステロイド誘導体の総称であり、肝臓においてシトクロム P450 (CYP) 酵素群によりコレステロールから合成され、消化管内での食物脂質の乳化・吸収を促進させる。近年、胆汁酸が核内受容体 FXR や G タンパク質共役受容体 TGR5 を介し糖代謝、脂質代謝を制御するシグナル分子である事、神経系のニューロンやグリア細胞で胆汁酸合成酵素や胆汁酸受容体が発現していることが報告され、その機能や生理的意義が注目を集めている。しかし、脳内の胆汁酸研究の報告はほとんどない。本研究の「脳」で「虚血ストレスに応答」する「胆汁酸」の役割を明らかにするという革新的な視点により、脳梗塞研究のさらなる発展に貢献できると考える。

2. 研究の目的

本研究は「虚血応答因子としての脳由来胆汁酸の生理的意義の解明」を目的としている。さらに「脳梗塞に伴う虚血領域ではニューロンから胆汁酸が合成され、梗塞領域周囲に出現する反応性アストログリオシスを抑制するとともに、そのシグナル活性化能や界面活性作用により神経組織の保護機能を有する」という具体的な見解を提唱しその全容解明を目指している。そのために、梗塞領域ニューロンにおける虚血依存的な脳由来胆汁酸合成亢進メカニズムの解明、梗塞脳における胆汁酸標的の同定と作用機序の解析、をおこない脳由来胆汁酸の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

【マウス中大脳動脈完全梗塞モデル】

マウス中大脳動脈完全梗塞 (pMCAO) モデルには CB17+/+マウス (8 週齢オス) を用いた。麻酔下で側頭部皮膚切開後、遠位顔面動脈焼灼・頬骨弓切断・顎関節開放の後、頭蓋底に約 2mm の小孔を開け、中大脳動脈を露出させた。パイポラにより中大脳動脈を焼灼切断した後、術部を閉じ皮膚縫合をおこなった。24 時間後にマウスを還流固定し急性凍結切片を作製し免疫組織染色に用いた。質量顕微鏡解析には未固定切片を作製し用いた。

【細胞培養および遺伝子導入】

マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro2a 細胞 (ATCC) を 10% FBS 含有 DMEM (Thermo Fisher) で培養した。海馬ニューロンを単離するために Wistar ラット胎児の脳を摘出し海馬部位を収集した。回収した海馬を 0.25% トリプシン (Thermo Fisher) と 0.1% DNase I (Takara) を含むハンクス平衡塩溶液中で 37、15 分間インキュベートした。海馬組織をピペティングにより穏やかに分散し、遠心分離後 2% B27 (Thermo Fisher) および 0.5% GlutaMAX™-1 (Thermo Fisher) を添加した Neurobasal medium (Thermo Fisher) に懸濁した。その後、ポリエチレンイミンコートした 18mm カバースリップ上に、10,000 cells/mL の濃度でプレーティングした。培養 7 日目に新鮮な培地に交換した。Neuro2a 細胞への遺伝子導入には、Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher) を使用した。海馬初代ニューロンへの遺伝子導入には、CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Takara) を用いた。

【免疫組織染色】

マウスを 4% パラホルムアルデヒド/0.1M PB にて灌流固定後、脳を摘出し 20% スクロース/0.1M PB に浸漬し、20 μm の急性凍結切片を作製した。一次抗体を 4 °C で一晚反応させ、PBS で洗浄後に二次抗体を室温で 1 時間反応させた。一次抗体には、ウサギ抗 CYP7A1 抗体 (Bioss, bs-2399R, 希釈倍率 1:500)、マウス抗 CYP7A1 抗体 (Millipore MABD42, 1:1000)、ウサギ抗 CYP27A1 抗体 (Bioss, bs-5049R, 1:500)、ウサギ抗 HSD3B7 抗体 (Bioss, bs-2366R, 1:500)、ウサギ抗 CYPB1 抗体 (Bioss, bs-5052R, 1:500)、ウサギ抗 CYP8B1 抗体 (MyBioSource, MBS9701830, 1:500)、マウス抗 NeuN 抗体 (Millipore, MAB377, 1:1000)、ウサギ抗 GFAP 抗体 (Dako, Z0334, 1:1000)、マウス抗 CC1 抗体 (Millipore, OP-80, 1:500)、ヤギ抗 Iba1 抗体 (Abcam, ab5076, 1:500)、ウサギ抗 AUF1 抗体 (Abcam, ab61193, 1:1000)、マウス抗 AUF1 抗体 (Boster, M09982, 1:1000) を用いた。二次抗体にはロバ抗マウス Cy5 抗体 (Jackson, 715-175-151, 1:400)、ロバ抗マウス Alexa Fluor 488 抗体 (Invitrogen A21202, 1:2000)、ロバ抗マウス Alexa Fluor 594 抗体 (Jackson,

715-585-151, 1:2000)、ロバ抗ウサギ Alexa Fluor488 抗体 (Invitrogen A21206, 1:2000)、ロバ抗ウサギ Alexa Fluor594 抗体 (Invitrogen A31572, 1:2000)、ロバ抗ヤギ Alexa Fluor488 抗体 (Invitrogen A11055, 1:2000)、ロバ抗ヤギ Alexa Fluor594 抗体 (Invitrogen A21432, 1:2000) を用いた。核染色には Hoechst33342 を用いた。

【リアルタイム PCR】

培養神経細胞およびマウス脳から Sepasol-RNA I Super G を用いて total RNA を抽出した。Total RNA 1 μ g から PrimeScript RT with gDNA Eraser kit (Takara) にて cDNA を合成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD qPCR mix (TOYOBO Life Science)、遺伝子特異的プライマー、Rotor-Gene Q システム (Qiagen) を用いておこなった。内部標準としてハウスキーピング遺伝子である Hprt1 を用い delta delta Ct 法を用いて相対的遺伝子発現レベルを解析した。

【ウエスタンブロット】

培養神経細胞およびマウス脳から RIPA buffer (Nacalai Tesque) を用いて可溶性画分を得た。Mini-PROTEAN TGX precast Gel (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE (総タンパク質量 20 μ g) をおこなった。泳動後、TransBlot Turbo Transfer system (Bio-Rad) を用いてウエスタンブロットをおこなった。Blocking One (Nacalai Tesque) を用いて室温で 1 時間ブロッキングをおこない、1 次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、0.05% Tween20 を含む TBS (TBS-T) で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。

【Cyp7a1 遺伝子欠損マウス作製】

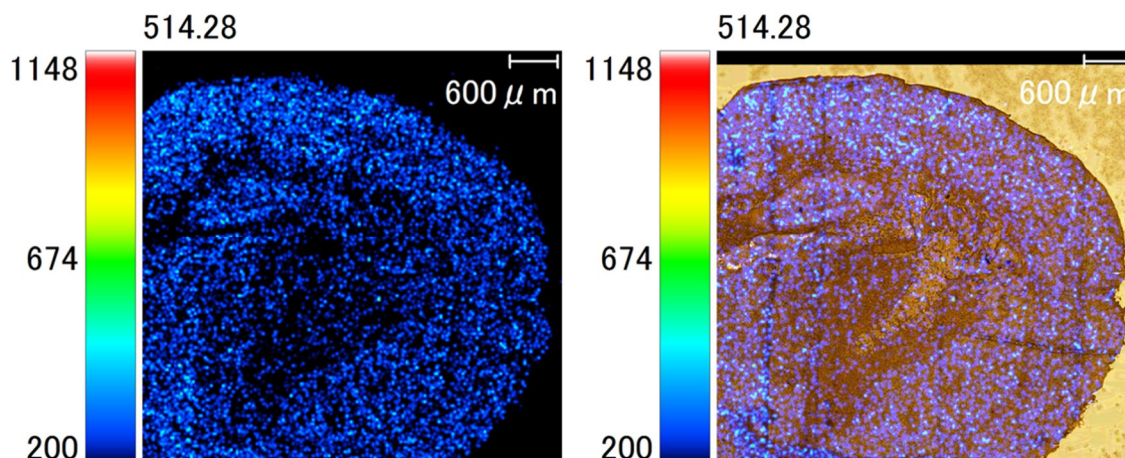
Cyp7a1 遺伝子座 (約 7300 塩基) を欠損するマウスを iGONAD 法により作製した。プラグを確認した ICR 雌マウスをメドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの 3 種混合麻酔薬で麻酔し、CRISPR/Cas9 RNP 複合体を卵管に注入し、エレクトロポレーション (Genome Editor, Becks) (50 V, ON 5 ms, OFF 95 ms, \pm pulse orientation, Cycle x4) により、卵管に投与した。マウスは直ちにアンチセダン注射で覚醒させた。RNP 混合物の組成は、Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (200 ng/ μ l, Integrated DNA Technologies)、Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA (200 ng/ μ l, Integrated DNA Technologies, 1073190) および Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 (400 ng/ μ l, Integrated DNA Technologies, 1081058) とし注入前に混合した。Cyp7a1 の標的配列は TATCATTGGAATAAGGAGA (エキソン 1) および TTGGGACTAGTGCTCACTGA (エキソン 6) である。ゲノム DNA シークエンスにより約 7300 塩基の欠失を持つ Cyp7a1 ヘテロノックアウトマウスを得た。このヘテロノックアウトマウス同士との交配によりホモノックアウトマウスを得た。

4. 研究成果

< 正常脳組織を用いた質量顕微鏡法解析 >

脳実質における胆汁酸類の存在を解析するために、CB17+/+マウスの未固定脳切片を作製し質量顕微鏡法によりタウロコール酸の検出をおこなった。その結果、大脳皮質、海馬等の領域においてタウロコール酸の質量分析ピーク ($m/z=514.28$) を確認した。これは標品による質量分析ピークと一致しており、またタウロコール酸が豊富に存在する肝臓を解析した場合のピークとも一致した。さらに、標品、肝臓切片、脳切片においてタンデム MS を実施した結果、 m/z がそれぞれ 353.249、353.231、353.250 と非常に近接したピークが得られた。これらの結果から、脳実質にタウロコール酸が存在していると考えられる。

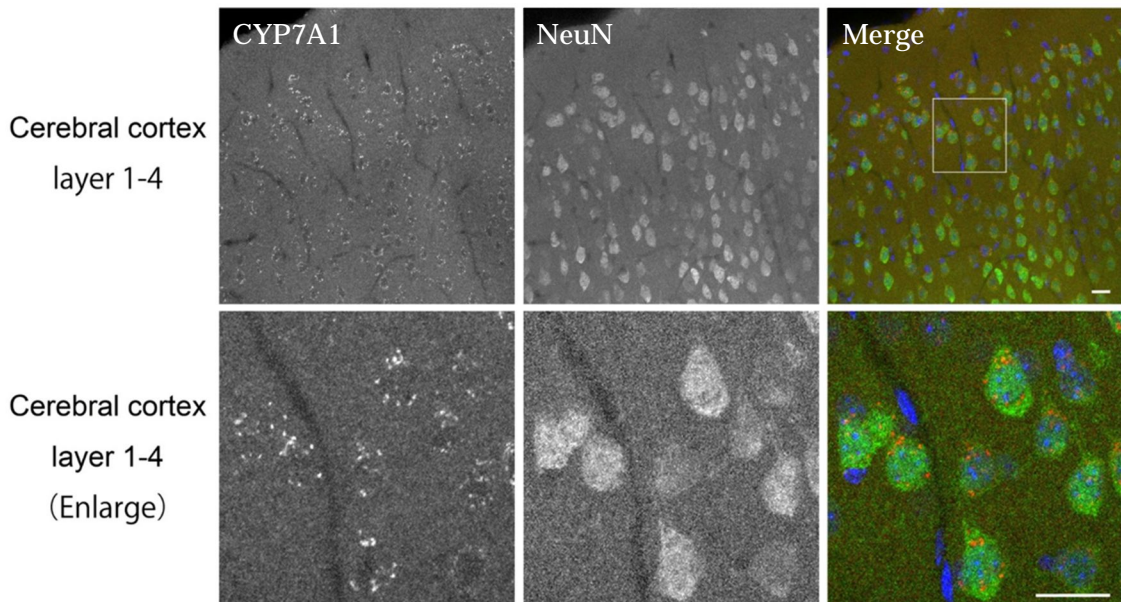
図 1: 質量顕微鏡法による脳実質でのタウロコール酸可視化



<脳における CYP7A1 発現>

胆汁酸合成経路には多くの酵素が関与しているが、CYP7A1 が律速酵素でありコレステロールの 7 位水酸化を担うことが知られている。脳での CYP7A1 発現を解析するため、CB17+/+マウスの急性凍結脳切片を作製し免疫組織染色法により CYP7A1 の検出をおこなった。その結果、大脳皮質、海馬、梨状皮質において NeuN 陽性ニューロンで CYP7A1 のシグナルを検出した。一方、GFAP 陽性アストロサイト、IBA1 陽性ミクログリア、CC1 陽性オリゴデンドロサイトでは CYP7A1 の発現は確認されなかった。さらに、脳組織可溶性画分を用いてウエスタンブロットを行い、CYP7A1 を検出した結果、CYP7A1 が高発現する肝臓の可溶性画分と同じ分子量のバンドを検出した。また、脳組織由来 total RNA から CYP7A1 をクローニングし GFP-CYP7A1 発現ベクターを構築した。これらの結果から、脳において胆汁酸合成律速酵素である CYP7A1 が発現していると考えられる。

図 2：免疫組織染色法による脳皮質での CYP7A1 局在



<Cyp7a1 ノックアウトマウスを用いた免疫組織染色>

脳における CYP7A1 発現を精査するために Cyp7a1 ノックアウトマウスを作製し免疫組織染色とウエスタンブロットをおこなった。iGNAD 法を用いて Cyp7a1 遺伝子座のほぼすべての領域を欠損するヘテロノックアウトマウスを作製し交配によりホモノックアウトマウス (Cyp7a1^{-/-}) を得た。このマウスの急性凍結脳切片を作製し免疫組織染色法により CYP7A1 の検出を試みたが検出されなかった。さらに Cyp7a1^{-/-} の脳可溶性画分を用いてウエスタンブロットをおこなった結果、ハウスキープング遺伝子である GAPDH は検出されたが CYP7A1 のバンドは検出されなかった。これらの結果から、脳組織で検出した CYP7A1 の免疫組織染色像およびウエスタンブロットのバンドは確かに CYP7A1 の存在を反映したものであると考えられる。

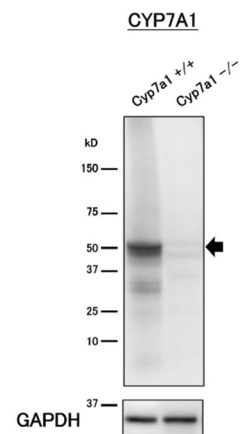


図 3：野生型マウスおよび Cyp7a1 ノックアウトマウス脳皮質での CYP7A1 発現確認

<マウス中大脳動脈完全梗塞モデルにおけるグリア細胞動態>

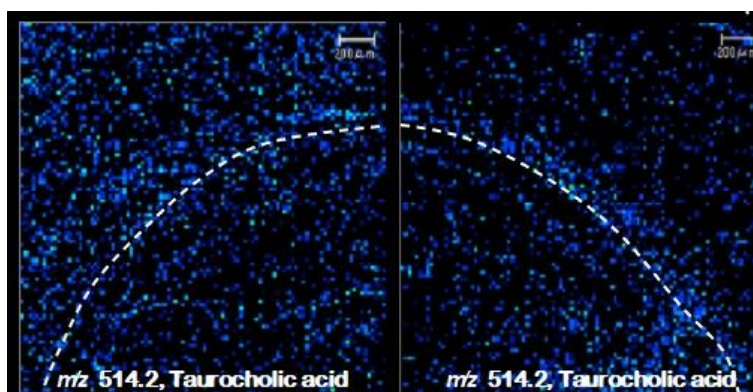
CB17+/+マウス (8 週齢オス) を用いてマウス中大脳動脈完全梗塞 (pMCAO) モデルを作製し灌流固定、急性凍結切片作製の後、免疫組織染色法にてグリア細胞動態を観察した。その結果、対側に比べて、梗塞領域周囲の脳梁部位において GFAP 陽性アストロサイトの染色性が顕著に亢進し細胞形態が劇的に変化していた。梗塞領域の中心部では GFAP 陽性アストロサイトはほとんど観察されなかった。また梗塞領域では IBA1 陽性ミクログリアの形態がアメーバ状に変化していた。さらに髄鞘のマーカータンパク質である MBP の免疫組織染色では梗塞領域での顕著な染色性亢進が観察され、また電子顕微鏡での観察により髄鞘崩壊が確認された。これらの結果は、梗塞領域においてアストロサイトとミクログリアが活性化し同時に脱髄が生じていることを示唆して

いると考えられる。

< 梗塞脳を用いた質量顕微鏡法解析 >

梗塞脳における胆汁酸類の存在量変化を解析するために、pMCAO マウスの未固定脳切片を作製し質量顕微鏡法によりタウロコール酸の検出をおこなった。その結果、対側に比べ梗塞領域におけるタウロコール酸シグナルの増強を確認した。さらに、CYP7A1 によりコレステロールから合成される 7-ヒドロキシコレステロールについても梗塞領域での存在量増加を確認した。梗塞領域で減少することが既知である AMP、ADP を検出した結果、確かに梗塞領域での減少が確認された。これらの結果から、梗塞領域においてタウロコール酸存在量が増加することが明らかとなった。

図 4：脳梗塞モデルマウス脳におけるタウロコール酸可視化



< 梗塞脳における胆汁酸合成関連酵素発現変化 >

梗塞領域における胆汁酸合成能変化を明らかにするために胆汁酸合成関連酵素群 (CYP7A1、HSD3B7、CYP27A1) の免疫組織染色をおこなった。その結果、対側に比べ梗塞領域での NeuN 陽性ニューロンにおいてこれらの酵素の染色性が増強することが明らかとなった。さらに培養ニューロンに対して脳梗塞状態をミミックする低酸素低グルコース刺激を与え、CYP7A1 の RNA 発現量をリアルタイム PCR で解析した結果、低酸素低グルコース刺激を与えた 3 時間後から 12 時間まで RNA 発現量が上昇した。これらの結果から、梗塞領域において CYP7A1 発現が上昇し胆汁酸合成が亢進することが示唆された。

< Cyp7a1 転写後発現制御機構解析 >

Cyp7a1 mRNA の 3' 非翻訳領域には RNA 安定性に関わる AU-rich element (ARE) が 9 つ存在する。梗塞領域での Cyp7a1 発現上昇に RNA 安定性制御が関与するかを検討するために、代表的な ARE 結合タンパク質である AU-rich binding factor-1 (AUF1) との相互作用を解析した。神経芽細胞種細胞株 Neuro2A 細胞において siRNA により AUF1 をノックダウンしリアルタイム PCR により Cyp7a1 発現量を解析した。その結果、コントロール siRNA に比べ AUF1 に対する siRNA を遺伝子導入した場合に、Cyp7a1 発現量が有意に減少した。また、正常脳組織における免疫組織染色により NeuN 陽性ニューロンにおいて CYP7A1 と AUF1 が共発現すること、梗塞領域周囲において AUF1 発現が上昇することを明らかにした。これらの結果から、AUF1 が 3' 非翻訳領域の ARE を介して Cyp7a1 mRNA 安定化を担い、梗塞条件下において一過性に発現上昇することで Cyp7a1 発現が上昇する可能性があると考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Souichi Oe, Taro Koike, Yukie Hirahara, Susumu Tanaka, Shinichi Hayashi, Yosuke Nakano, Masahiko Kase, Yasuko Noda, Hisao Yamada, Masaaki Kitada	4. 巻 534
2. 論文標題 AUF1, an mRNA decay factor, has a discordant role in Cpeb1 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 491-497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.054.	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 Oe S, Kimura T, Yamada H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulatory non-coding RNAs in nervous system development and disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in bioscience (Landmark Edition)	6. 最初と最後の頁 1203-1240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2741/4776	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大江 総一, 柿崎 梨緒, 阪本 純加, 北田 容章
2. 発表標題 グリオーマ幹細胞特異的な非コードRNAの同定および機能解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿崎 梨緒, 阪本 純加, 大江 総一, 北田 容章
2. 発表標題 グリオーマがん幹細胞におけるmicroRNA-505の機能解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪本 純加, 柿崎 梨緒, 大江 総一, 北田 容章
2. 発表標題 グリオーマがん幹細胞における lncRNA MANCR の機能解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 啓子, 平原 幸恵, 小池 太郎, 蒲生 恵三, 田中 進, 大江 総一, 大江 知里, 吉田 崇, 津田 雅之, 本家 孝一, 北田 容章
2. 発表標題 質量顕微鏡を使った腎臓における硫酸化糖脂質分子種の同定と可視化
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 洋輔, 中井 悠稀, 丸山 正人, 田中 進, 林 真一, 大江 総一, 北田 容章
2. 発表標題 グリオーマモデルマウスにおける癌幹細胞マーカー分子SSEA-1
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Array tomographyとCLEMを用いた神経突起周囲サテライトグリア細胞の観察
2. 発表標題 小池 太郎, 田中 進, 加瀬 政彦, 平原 幸恵, 林 真一, 大江 総一, 中野 洋輔, 北田 容章
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大江総一, 和田早織, 平原幸恵, 山田久夫, 北田容章
2. 発表標題 虚血脳における胆汁酸産生解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大江総一, 平原幸恵, 和田早織, 齊藤育, 山田久夫, 北田容章
2. 発表標題 虚血脳における胆汁酸産生の解析
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oe S, Hirahara Y, Wada S, Yamada H, Kitada M
2. 発表標題 Analysis of bile acid synthesis in acute stage cerebral ischemia.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 早織
2. 発表標題 虚血脳における胆汁酸産生の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江 総一
2. 発表標題 虚血脳におけるCYP7A1発現制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西医科大学 医学部 基礎社会学系 解剖学講座 http://www3.kmu.ac.jp/anatomy/
--

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

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