

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17828

研究課題名（和文）脳の老化性変化を誘導するmicroRNAの同定

研究課題名（英文）Identification of microRNAs that induce senescent changes in the brain

研究代表者

高田 忠幸（Takata, Tadayuki）

香川大学・医学部・寄附講座教員

研究者番号：10714272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、miRNAアレイから得られたサンプルのmiRNAプロファイリングを用いて、SAMP8の脳幹で発現が上昇または低下したマイクロRNA（miRNA）を同定した。5ヶ月齢の雄性SAMP8マウスを用い、正常対照群と比較した。SAMP8マウスの脳幹では、miR-491-5pとmiR-764-5pが発現上昇し、miR-30e-3pとmiR-323-3pの発現が低下していた。miRNA発現の変化を調べることで、加齢に関連した神経病理学的変化の初期段階における分子的証拠が得られる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではモデルマウスを用いることで、早期の段階で変性が生じた部位とその後に変性が拡がることが知られている部位同士を比較することで、miRNAの発現の違いを比較した。老化変性の拡大のトリガーとなるmiRNAやその一連の発現パターンから老化の進行へのヒントを得ることができた。これまではヒトではBraak仮説など、病理学的な老化性変化の拡大パターンは報告されていた。それになぞらうようにモデルマウスでmiRNAの発現パターンを今回の研究では示すことができた。miRNAでは単独の信号変化を追うのではなく、一連の信号変化を考慮した考察が今後は必要であることが予想された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, microRNAs (miRNAs) that were upregulated or downregulated in SAMP8 brainstems were identified using miRNA profiling of samples obtained from miRNA arrays. The preliminary stage of cognitive dysfunction was examined using male 5-month-old SAMP8 mice, with age-matched senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice as controls. A Y-maze alternation test was performed to assess short-term working memory, and miRNA profiling was conducted in each region of the dissected brain. SAMP8 mice tended to be hyperactive, but short-term working memory was preserved. Two miRNAs were upregulated (miR-491-5p and miR-764-5p), and two were downregulated (miR-30e-3p and miR-323-3p) in SAMP8 brainstems. Changes in miRNA expression may lead to the induction of target proteins during the early stages of neurodegeneration in the brainstem. These findings suggest that studying altered miRNA expression may provide molecular evidence for early age-related neuropathological changes.

研究分野：老化 認知症

キーワード：SAMP8 mouse neurodegeneration aging brainstem microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では SAM を用いて miRNA における「老化の拡がりに関連する modulator は何か」を追求する。miRNA はタンパク質をコードしない小型一本鎖 RNA である。この miRNA が標的 messenger RNA (mRNA) の翻訳の中断あるいは遺伝子発言を制御していることが明らかとなってきた。SAM の中でも今回扱う SAMP8 における miRNA の報告は少なく、2014 年に Zhang らが海馬における酸化ストレスと miR-329 や miR-193b, miR-20a, miR-296, miR-130b の関連性を示している。SAMP8 は 4~12 ヶ月齢以降に記憶や学習、作業能力の低下を認める。組織学的には 5 ヶ月齢で大脳皮質の神経変性を認め、約 12 ヶ月齢では老人斑や神経原線維変化は認めないが、アルツハイマー病と同様なリン酸化タウやアミロイド の沈着がみられる。ヒトにおいて代表的な老化性変化の組織学的変化の拡がりについては、アルツハイマー病は 1991 年の Braak らの報告で (図 2)、神経原線維変化が初期には側頭葉内側から外側へ、その後大脳皮質に拡がり、最終的に中心前回まで拡がる。また、同様にレビー小体病については 2003 年の Braak の報告で、嗜銀顆粒性認知症も 2004 年に Saito らの報告で一定の規則に従って変性病理が拡がることは知られている。しかしこれらの老化性変化の異常蛋白の拡がりには認知機能正常のヒトにおいても限局して混在してみられることが多く、病的に脳の広範に変性が拡がる個体とそうでない個体の違いがなにか不明である。SAMP8 は加齢に伴う事象を包括的に呈するモデルであるため、今回 SAMR1 と SAMP8 の miRNA を解剖学的に異なる局在で miRNA を測定することで、老化性変化の拡がりの modulator を特定することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に以下の点を明らかにする。

1. 20 週齢の SAMR と SAMP8 の認知機能評価と組織学的な差を確認する。
2. 海馬、大脳皮質、脳幹の解剖学的に異なる部位別にエクソソーム中の miRNA を測定し、特異的に増加または減少する miRNA を同定する。
3. その結果を用いて SAMR 群と SAMP8 群の群間差から得られる miRNA の差と、それぞれの群内における解剖学的に異なる部位別の miRNA の発現差が有意なものを同定する。その中で、老化性変化の拡がりの modulator となる可能性のあるものを抽出する。
4. 変性の modulator と考え得る蛋白を同定し、治療ターゲットになり得るか検討する。
5. 副次的に本研究の結果は、SAM の miRNA の基礎データとなることから、他の研究者も幅広く研究に応用できるよう、miRNA の結果を提示する。

3. 研究の方法

1. 対象：雄のマウス (日本 SLC 社, SAMR1/TaSlc と SAMP8/TaSlc) を用い、それぞれ、SAMR group, SAMP8 group とする。
2. 方法
 - 2.1. 全てのマウスは、20 週齢まで自由に食物と水分を摂取できる環境に置く。
 - 2.2. Y 字型迷路試験を施行し、8 分間にわたって迷路内を自由に探索させ進入したアームを順に記録する。動物が測定時間内に各アームに進入した回数 (総アーム進入回数) および連続して異なる 3 本のアームに進入した組み合わせの数 (交替行動数) を調べ、以下の式より交替行動率 (%) を算出し、短期記憶の指標とする (交替行動率% = 交替行動数 ÷ (総アーム進入回数 - 2) × 100)。
 - 2.3. 2.2. の後にペントバルビタールで麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で還流後に 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定を行う。脳を採取し、各群 1 匹は組織評価用に後固定し、残りの検体の海馬、大脳皮質、脳幹を miRNA 測定用に保存する。
 - 2.4. 組織学的評価 前額断で 6µm 厚のパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色で neuron loss や spongiosis の有無を確認し、既報の報告と相違ないか確認をする。
 - 2.5. 本研究の研究対象であるエクソソームを以下の手順で回収する。
 - 2.5.1. TissueLyser (QIAGEN 社, 小型破砕機) を用いて脳サンプルをホモジナイゼーションした後、15~25 °C で 5 分間放置する。
 - 2.5.2. 140µl のクロロホルムを添加し、15 秒激しく混和後、15~25 °C で 2~3 分間放置する。
 - 2.5.3. 4 °C, 12,000 × g で 15 分間遠心操作を行う。
 - 2.5.4. 上清をコレクションチューブに移し、1.5 倍容量の 100% エタノールを添加・混和する。
 - 2.5.5. 2ml コレクションチューブの中にセットした RNeasy Mini (QIAGEN 社, RNA isolation kit) スピнкаラムに最大 700µl のサンプルをピペットでアプライする。15~25 °C, 8,000 × g 以上で 15 秒間遠心操作を行う。上清は破棄する。4. の残サンプルを繰り返しこの工程を行う。

2.5.6. 500 μ l の Buffer RPE (QIAGEN 社, 洗浄バッファー) を RNeasy Mini スピнкаラムに添加する。8,000 \times g 以上で 15 秒間遠心してカラムを洗浄し, 3 液は破棄する。

2.5.7. RNeasy Mini スピнкаラムへ 500 μ l の Buffer RPE を添加し, 8,000 \times g 以上で 2 分間遠心操作する。

2.5.8. RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 1.5ml コレクションチューブに移し, 30~50 μ l の RNase フリー水を直接 RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンにピペットでアプライする。8,000 \times g 以上で 1 分間遠心操作を行い, RNA を溶出する。

エクソソーム中の miRNA の解析

miRNA 発現の解析には miRNA アレイチップを用いて, 以下の示す手順で行う。それぞれのエクソソーム溶液から miRNA を回収し (Ambion 社, mirVanaTM miRNA isolation kit), これをアレイ用のサンプルとする。miRNA アレイ (東レ) に, 標識 (Ambion 社, mirVanaTM miRNA labeling kit) したサンプルをハイブリダイゼーション後, アレイ用スキャナーでスキャンを行う。その後解析ソフトウェア Array-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics, Inc.) を用いて得られたイメージ画像 (TIFF 画像, 16bit 形式) から, 各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行い, シグナル値を算出し miRNA を同定する。群の miRNA 発現プロファイルをクラスター解析も含めた統計学的解析を行う。有意な変動を認められた miRNA については, miRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量する (Thermo Fisher Scientific 社, Taqman MicroRNA Assays)

4. 研究成果

20 週齢の SAMR1 と SAMP8 のマウス間では Y 字迷路における alternation behavior rate には有意差がみられず, 短期記憶は SAMP8 では維持されていたが, locomotor activity counts に関しては有意に SAMP8 群で上昇しており, 過活動の状態であった。したがって, ごく軽度の認知機能の差を確認することができた。脳幹, 海馬, 大脳皮質での病理学的変化は既報の変性所見と相違なく, miRNA の解析をすすめることに問題はなかった。まずはアレイによって miRNA の解析を行い, SAMP8 の脳幹で特異的に発現が亢進していたもの (miR-491-5p と miR-764-5p), または低下していたもの (miR-30e-3p and miR-323-3p) をベンズを用いて同定することができた。これらの miRNA が脳幹, 海馬, 大脳皮質の順に miRNA の発現が段階的に変化していた。miR-491-5p の発現レベルの変化は脳幹で病理学的に変性が先行していることから, 認知機能の変化に先行することを示している可能性が考えられた。miR-764 の過剰発現は, NINJ2 発現を調節することによってニューロンの成長のプロモーターとして機能したことが考えられた。miR-764-5p は SAMP8 マウスの脳幹で上方制御されており, これは神経細胞のアポトーシスが脳幹で誘導され, その結果, 加齢に伴う変性が最初に脳幹で起こる可能性が高いことが示された。miR-30e-3p の下方制御はホスファターゼおよびテンシンホモログ (PTEN) 機能を活性化し, 中枢神経系でアポトーシスを誘導する可能性があることが示された。これより, 大脳や海馬に先行して脳幹でアポトーシスは発生する可能性が高いと推測できた。miR-323-3p は, in vitro および細胞内生理学的条件下で APP 発現を低下させることが報告されており, APP の蓄積はアミロイド の過剰産生, 蓄積, 沈着を引き起こし, 最終的にはニューロン死につながる。以上からなんらかの加齢性変化のトリガーが脳幹から生じている可能性が考えられた。本研究では脳幹より吻側の部分的な評価であり, 脳幹より末梢の組織からの変性の起点も考えておかなければならない点は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawakita Rie, Takata Tadayuki, Nonaka Wakako, Hamada Yasuhiro, Iwama Hisakazu, Kobara Hideki, Deguchi Kazushi, Miyamoto Osamu, Nakamura Takehiro, Itano Toshifumi, Masaki Tsutomu	4. 巻 28
2. 論文標題 Age-related brainstem degeneration through microRNA modulation in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2023.13032	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rie Kawakita, Tadayuki Takata, Wakako Nonaka, Yasuhiro Hamada, Hisakazu Iwama, Hideki Kobara, Kazushi Deguchi, Toshifumi Itano, Tsutomu Masaki
2. 発表標題 Differential expression of miRNAs in the brainstem of SAMP8
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------