

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 9 日現在

機関番号：1 5 2 0 1

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013 ~ 2015

課題番号：2 5 4 6 0 2 4 3

研究課題名 (和文) 中枢神経系の組織形成に關与するマイクロRNAの探索とその役割の解明

研究課題名 (英文) Study of microRNA in histogenesis of the cerebrum in mouse embryos

研究代表者

橋本 龍樹 (HASHIMOTO, Ryuju)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：9 0 2 5 2 9 0 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 大脳皮質の組織形成機構の解明を目的とし、マイクロRNAの研究を行った。胎生12日 (E12) からE15のマウス胎仔大脳のマイクロRNA発現量について解析した。最も増加したlet7b-5pであり、最も減少したのはmir409-3pであった。発現パターンは、let7b-5pでは、E12に終脳の一部の細胞に発現し、E15では、大脳の全層に発現し、特に脳室帯の神経上皮細胞に強い発現を認めた。mir409-3pでは、E12に終脳全層の細胞に強く発現していた。二重鎖let7b-5pを作製し、E13の胎仔脳室へ注入した。その結果、E15の大脳において、脳室面には凹凸があり、細胞の配列に乱れを認めた。

研究成果の概要 (英文) : We searched the microRNAs (miRNAs) which were related to histogenesis of the cerebrum in mice and analyzed their roles in the development of the cerebral cortex. We analyzed the change in expression of miRNAs. We chose let7b-5p, which showed the most increased miRNA level from E12 to E15 and mir409-3p, which showed the most decreased miRNA level in the same period. Using RNA interference to analyze the function of let7b-5b, we injected the double strand RNA of let7b-5p into the ventricle of mouse embryos on E13 using in-utero operation. Roughness around the ventricle was observed and irregularity of cell arrangement was detected around the cells in the part of cerebral cortex on E15. The most of cells in which ds RNA were detected were S phase in the cell cycle. The roles of these miRNAs were to regulate histogenesis in the cerebral cortex during embryonic period.

研究分野：解剖学

キーワード：中枢神経系 マイクロRNA 組織形成

1. 研究開始当初の背景

これまで、生物の個体発生のメカニズムを、ホメオボックス遺伝子を含む転写調節因子の発現による細胞の分化と成長因子の産生調節によって説明されてきた。しかし、近年エクソンだけではなく、遺伝子をコードしていない広い範囲のゲノムが転写されている事が分かってきた。転写される RNA には蛋白に翻訳される mRNA と、遺伝子以外の部分で転写される遺伝子の発現制御機能を持つ RNA の 2 種類があり、これら 2 種類の RNA を合わせてトランスクリプトームと呼ばれており、その翻訳されない noncoding RNA の一部に遺伝子発現調節に働いているマイクロ RNA が発見された。このマイクロ RNA が、転写調節因子とそれによって調節される遺伝子の間で、転写を調節していることが分かってきた。また、マイクロ RNA の配列は、現在マウスでは約 2000 種類以上同定されており、1 つのマイクロ RNA の配列が複数の遺伝子の転写の制御にかかわっている事が知られている。現在、マイクロ RNA を含む noncoding RNA を含む RNA の研究が急激に進んでおり、これまでのような、「遺伝情報は DNA→(複製)→DNA→(転写)→RNA→(翻訳)→タンパク質の順に伝達される。」という、分子生物学におけるセントラルドグマだけで発生現象を説明できない領域まで生物学の研究は進んできた。

2. 研究の目的

転写される RNA には、蛋白に翻訳されるメッセンジャーRNA(mRNA) と、遺伝子以外の部分で転写される遺伝子の発現制御機能を持つ RNA の 2 種類があり、これら 2 種類の RNA を合わせてトランスクリプトームと呼ばれている。その翻訳されない noncoding

RNA の一部に遺伝子発現調節に働いているマイクロ RNA(マイクロ RNA) と転写調節因子によって調節される遺伝子の間で、転写を調節していることが分かってきた。中枢神経系の組織形成に関与しているマイクロ RNA を探索し、それらの役割を解明する。これまでの DNA から mRNA へ転写し、蛋白質へ翻訳するという分子生物学におけるセントラルドグマとは別の視点から、中枢神経系における組織形成機構を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

まず、マイクロアレイ解析と定量的 RT-PCR 解析を行うためにマウス (C57BL6J 系) のマウス胎仔の妊娠 12 日目 (E12) から E15 の午後 0 時に母獣より帝王切開によって胎仔を取り出し、それぞれの胎齢を E12.5, E13.5, E14.5, E15.5 とし、RNA 抽出用には大脳 (終脳) のみを採用した。採取した大脳より総 RNA を抽出し、2240 種類のマイクロ RNA の発現パターンを、E12.5 の時点におけるマウス胎仔大脳における発現量を 1 とした場合、E13.5, E14.5, E15.5 の相対的発現量の測定をマイクロアレイ解析によって行った (Filgen 社)。次に、マイクロアレイ解析によって、E12.5 の時点より E13.5 から E15.5 の間において、発現量が最も増加した miR98-5p, miR128-3p, let7b-5p の 3 種類と、発現量が最も減少した miR431-5p, miR409-3p した 2 種類のマイクロ RNA の発現量を、E12.5 から E15.5 の間発現量が変化しなかった miR7116-5p との比較による相対的発現量について定量的 RT-PCR 解析を行った (Filgen 社)。また、分裂期にある細胞を標識することを目的に、E12.5 と E15.5 の胎仔を取りだす 3 時間前に、5- ethynyl-2'-deoxy Uridine (EdU) 25mg/kg を母獣の腹腔に内投

与し、胎仔を取り出した。E12.5 の胎仔は頭部を、E15.5 の胎仔は脳を取り出し、10%ホルマリンと 70%メタノールの溶液にて固定し、通常の方法にて連続切片を作製し、Cloik-iT EdU Kits (Invitrogen 社) のマニュアルに従って、発色反応を行った。定量的 RT-PCR 解析の結果、この期間において発現量が最も増加した let7b-5p と最も減少した miR409-3p に対するジゴキシゲニンによって標識されたプローブを作製し、Exiqon 社によるマニュアルに従って in situ hybridization をおこなった。なお、陰性コントロールとして LNA scrambled microRNA control probe を用いた。次に、この期間において発現量が最も増加した let7b-5p の作用について解析する目的で、その RNA の作用を抑制させるために働く 2 本鎖 RNA (let7b-5p) を作製し、in utero にて 1 pM/μl を 1 μl を胎仔側脳室へ投与実験を行った。対照実験として、同腹の胎仔に影響を与えないことが確かめられている 2 本鎖 RNA を注入した。なお、ds let7b-5p の 5'末端は fluorescein にて標識した (Sigma 社製)。対照実験用に影響を与えないことが確かめられている fluorescein にて標識 2 本鎖 RNA (SIC-001) (Sigma 社製) を注入した。注入後、マウス胎仔頭部に電気刺激 (10 V, on 30 msec, off 970 msec 3 cycles)。注入時期として E12 にマウス胎仔側脳室へ 2 重鎖 RNA を注入し、電気刺激を与えたが、同腹に対照実験用の dsRNA を注入した胎仔は E15 に生存しているのに対し、ds let7b-5p を注入した胎仔は E15 に生存することができなかった。そのため、注入時期を E13 に決定した。2 重鎖 RNA が導入された細胞を同定するために、4 %パラホルムアルデヒド溶液にて固定し、凍結後、凍結切片を作製し、

共焦点レーザー顕微鏡にて取り込まれた細胞を確認した。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析

解析した 2240 種類のマイクロ RNA の中で E12.5 の発現量より 2 倍以上増加したマイクロ RNA は、E13.5 においては 29 種、E14.5 で 38 種、E15.5 で 67 種であった。一方、0.5 以下に減少したマイクロ RNA は、E13.5 では 66 種、E14.5 は 34 種、E15.5 は 57 種であった (図 1)。E15.5 において、発現量が増加していたマイクロ RNA の上位は、miR98-5p, miR128-3p, let7b-5p, let7c-5p であった (図 2)。E15.5 において、減少していたマイクロ RNA の上位は、miR409-3p, miR431-5p, miR127-3p, miR370-3p, であった (図 3)。なお、E15.5 の増加及び減少した上位 10 番目までは、E14.5 でも同様の順位であった。

この結果より、定量的 RT-PCR によって解析するマイクロ RNA を、増加した miR98-5p, miR128-3p, let7b-5p と減少した miR409-3p, miR431-5p 決定した。

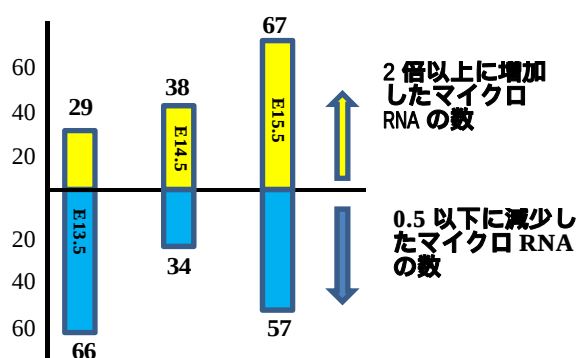


図 1. 発現量が大きく変化したマイクロ RNA (マイクロアレイ解析)

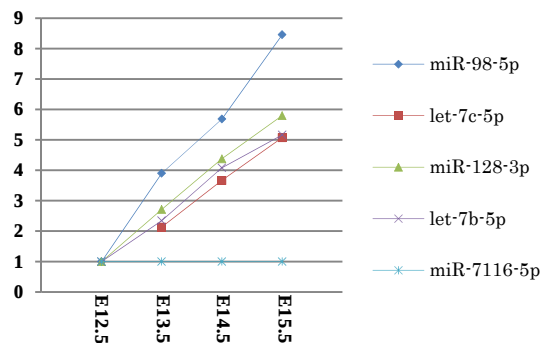


図 2 . 増加したマイクロ RNA の上位 4 種類
(マイクロアレイ解析)

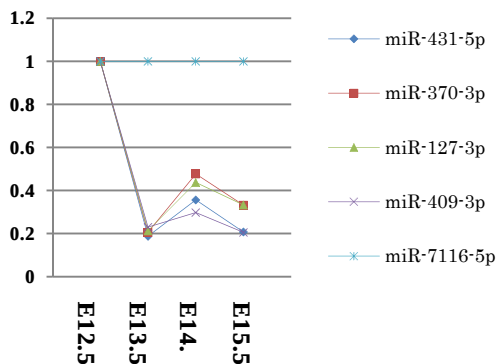


図 3 . 減少したマイクロ RNA の上位 4 種類
(マイクロアレイ解析)

定量的 RT-PCR 解析

まず、増加した miR98-5p, miR128-3p, let7b-5p の発現量は、E14.5 に増加し、E15.5 においてやや減少した (図 4)。減少した miR409-3p, miR431-5p は、E13.5 では減少し、E14.5 では変化なく、E15.5 において減少した (図 5)。これまでの報告では、miR98-5p は、心筋細胞や筋芽細胞における発現が報告されている。miR128-3p は神経芽細胞腫において発現し、let7b-5p は卵巣黄体のルテイン細胞に発現していることが報告

されている。miR409-3p は、悪性リンパ腫や膵臓癌などのガン細胞に発現し、miR431-5p は胃癌や膀胱癌などガン細胞に発現が報告されている。この結果より、最も増加した in let7b-5p と最も減少した miR409-3p の発現部位を、in situ hybridization によって解析した。

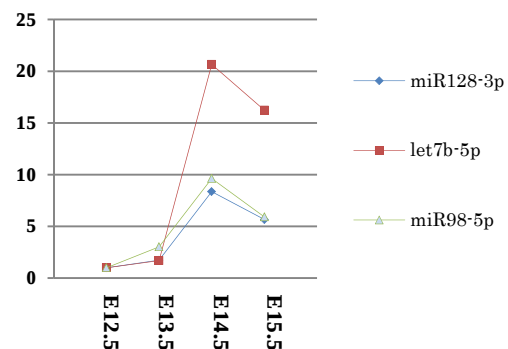


図 4 . 増加したマイクロ RNA の定量的 RT-PCR 解析

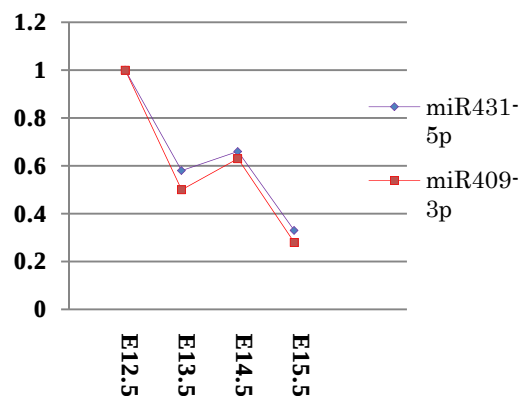


図 5 . 減少したマイクロ RNA の定量的 RT-PCR 解析

In situ hybridization によるマイクロ RNA の発現部位と分裂期の細胞の解析

1) let7b-5p の発現部位 (図 6)

E12.5 においては、終脳の intermediate zone (IZ)の一部の細胞の核周囲に発現を認めた。また ventricular zone (VZ)の細胞には発現を認めなかった。E15.5 においては、大脳の全層に発現し、特に VZ の神経上皮細胞の

脳室側に強い発現を認めた。Marginal zone (MZ)と upper layer (UL)に、多くの発現を認めた。S 期にある細胞とそれ以外の細胞との間に、発現部位において差を認めなかった。このことから let7b-5p は細胞分裂には関与していないが示唆された。

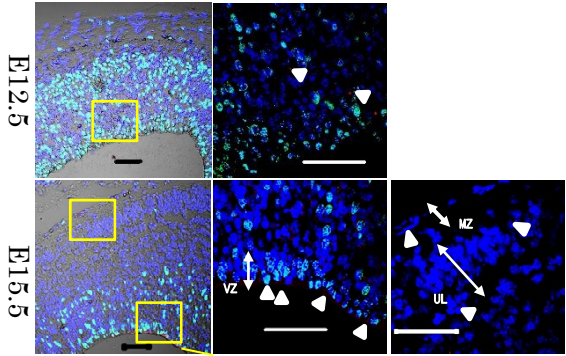


図 6 . E12.5 と E15.5 における let7b-5p の発現部位
図中のスケールは 100μm

2) miR409-3p の発現部位 (図 7)

E12.5 においては、終脳の全層のすべての細胞の細胞質全体に強く発現していた。E15.5 においては、大脳の全層の細胞に発現していたが、細胞内の核周囲に限局して発現していた。S 期にある細胞とそれ以外の細胞との間に、発現部位において差を認めなかった。このことから miR409-3p は細胞分裂には関与していないことが示唆された。

2 本鎖 RNA (si-let7b) の脳室への注入による let7b-5p の作用の解析

2 本鎖 RNA を E13 に脳室内へ注入し、E15 に取りだした胎仔大脳の大きさにおいて、対照群と比較して、有意差を認めることはなかった (表)

表. Effect of si-let7b on the cerebral development on E15

Group	Dams	Pups	Brain weight (SD) (g)	Brain width (SD) (mm)
Control	2	6	0.054 (0.003)	4.82 (0.31)
Ds-let7b-5p	2	9	0.051 (0.003)	4.76 (0.23)

標識された 2 本鎖 RNA は両群ともに、側脳室上部または下部に取り込まれた細胞を認めた (黄色楕円内) (図 8)。2 本鎖 let7b-5p が側脳室へ注入することにより、取り込まれた細胞において let7b-5p が分解され、その作用を抑制された状態を作り出した。その結果、取り込まれた細胞周囲の脳室面には凹凸があり、細胞の配列に乱れを認めた。

一方、対照実験用 2 本鎖 RNA が取り込まれた細胞周囲の脳室面には凹凸を認めなかった。2 本鎖 RNA を取り込んだマウス胎仔大脳の切片における EdU を取り込んだ S 期の細胞を観察すると、2 本鎖 let7b-5p を取り込んだ細胞の周囲において、コントロール群と比較して、S 期の細胞がやや多く、そのことが大脳の脳室面に凹凸があることと関係があると推測された。その事より、取り込まれなかった周囲の細胞は細胞分裂が止まっている中、2 本鎖 RNA を取り込まれた細胞は、細胞分裂が継続していることが推測された。大脳皮質の神経上皮細胞が分裂し、ニューロンへ分化する時期にもっと増加した let7b-5p の役割は、細胞分裂を抑制することが推測された。

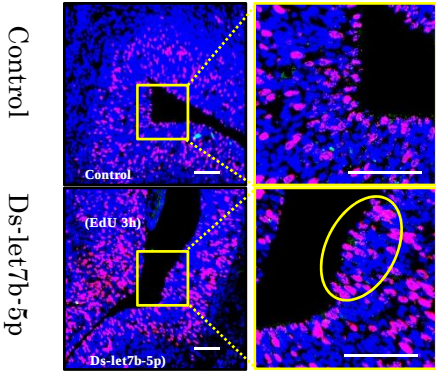


図 7 . 2 本鎖 RNA を注入した E15 のマウス胎仔大脳の形態学的解析。図中のスケールは 100μm

なお、現在 E12 から E15 の間で発現量がもっと減少した miR409-3p の作用を解明する

目的で、5'末端が fluorescein にて標識された (Sigma 社製) 1 本鎖の miR409-3p を E13 のマウス胎仔脳室へ注入することにより、過剰に存在する状態を作り出し、E15 に胎仔を取り出し、形態学的に解析を行っている。

本研究によって、マウス胎仔の脳における組織形成において、多くのマイクロ RNA が関与している可能性があることが分かった。調節機構として、マイクロ RNA の発現量を増加させて調節する場合と発現量を減少させて調節している場合があることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, Otani H. In vivo Analysis of Arg-Gly-Asp Sequence/Integrin $\alpha 5 \beta 1$ -Mediated Signal Involvement in Embryonic Enchondral Ossification by exo utero Development System. Journal of Bone Mineral Research. 査読有, 29, 2014, 1554-1563
- 2) Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. Molecular and Cell Biology, 査読有, 34, 2014, 3096-3105
- 3) Jahan E, Matsumoto A, Rafiq AM, Hashimoto R, Inoue T, Udagawa J, Sekine J, Otani H. Fetal jaw movement affects Ihh signaling in mandibular condylar cartilage development: the possible role of Ihh as mechanotransduction mediator. Achieves of Oral Biology 査読有, 59, 2014, 1108-1118

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 橋本龍樹、松本暁洋、井上隆之、大谷 浩、中枢神経系の組織形成に関するマイクロ RNA の探索とその役割の解明、第 119 回日本解剖学会全国学術集会、平成 26 年 3 月 27 日 ~ 29 日自治医科大学、下野市
- 2) 橋本龍樹、松本暁洋、大谷 浩、マイクロ RNA のマウス胎仔脳の組織形成における役割、第 55 回日本先天異常学会学術集会、第 38 回日本小児遺伝学会学術集会合同開催、2015 年 7 月 25 日 ~ 7 月 27 日、パシフィコ横浜会議センター、横浜市
- 3) Hashimoto R, Kihara I, Matsumoto A, Otani H. Role of microRNA in histogenesis of the cerebrum in mouse embryos. 45th Annual Meeting Neuroscience 2015, Chicago, IL. USA, October 17-21, 2015

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 龍樹 (HASHIMOTO, Ryuju)
島根大学医学部・教授
研究者番号 : 90252907

(2) 研究分担者

大谷 浩 (OTANI, Hiroki)
島根大学医学部・教授
研究者番号 : 20160533
松本 暁洋 (MATSUMOTO, Akihiro)
島根大学医学部・助教
研究者番号 : 70346378
井上 隆之 (INOUE, Takayuki)
島根大学医学部・助教
研究者番号 : 50581386
(平成 25 年度のみ)