

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640019

研究課題名(和文)ニューロン間で伝搬するマイクロRNAの同定とその機能に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Contribution of brain-specific miRs in the neuronal and glial function and possible transmission of miRs between cells.

研究代表者

沼川 忠広 (Numakawa, Tadahiro)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・客員研究員

研究者番号：40425690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA (miRs)は様々な疾患の病態マーカーとしての可能性がある。本研究では脳特異的なmiRsの機能解析とそれがニューロン間でシグナルを伝達する可能性を検討した。BDNF刺激によりcortexから放出されるエクソソーム含有のmiRsを定量解析した結果、測定を試みたmiRs(miR1, 124a, 132、等)では全て検出限界以下の値を示したが、BDNF刺激後いくつかの種類miRsが検出された。一方、これまでほとんど報告のなかったグリア細胞においてはbFGFがmiR-134を増加させ、その反応を介してグルタミン酸回収能力を増強させるなどの作用を有することを論文報告した。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that changed blood level of miRs is beneficial biomarker of diseases including brain dysfunction. In this study, we examined function of brain-specific miRs in the neuronal and glial system, and a possibility of miR transmission among cells. We found that upregulation of several brain-specific miRs in exosome released from cultured cortical neurons after application of BDNF, which is essential growth factor for neural function in the central nervous system neurons. On the other hand, bFGF, which is involved in glial survival and differentiation, increased the levels of miR-134. Furthermore, we found that the bFGF/miR-134 system is important for maturation of astroglia, including upregulation of glutamate transporter.

研究分野：神経科学

キーワード：microRNA 神経伝達 神経栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小さな non-coding RNA である microRNAs(以下 miRs)は、ターゲット遺伝子の発現を抑制することで、細胞における機能の制御をされると考えられている。また、がんや、アルツハイマー病などの脳疾患の発症や病態と、各種の miRs 発現の変化が関係している可能性、すなわち病態マーカーとして有用性にも注目が集まっている。

(2) 最近、脳における miR の機能に関心が集まってきており、申請者らも、中枢ニューロンの生存維持や神経伝達機能の発揮に重要な働きをする脳由来神経栄養因子(BDNF)には、miR-132 の発現誘導を介して、シナプス関連蛋白質を増加させる機能があることなどを報告していた(Numakawa et al., *Neurochem Int.* 2011)。これは、ニューロンに特異的に発現している miR が、そのニューロン内において、神経伝達制御に寄与する遺伝子の発現を変化させることを介して、神経機能を制御する、という前提に基づいている。他の研究グループによる miR 研究においても、これまでの解析ではやはり、miR のターゲット遺伝子の発見は重要であり、力がそそがれている。

(3) 興味深いことに、連携研究者である橋戸らは、Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて、特定の miR の量的変化が、病気のマーカーとなり得る可能性を報告した(Mizuno et al., *PLoS One* 2011)。これは、特定の組織から、特異的な miRs が能動的に放出されている可能性を示していた。

## 2. 研究の目的

(1) miRs は、細胞内においてターゲット遺伝子の発現の抑制などを介して、細胞機能を制御しているとされる。しかし、特定の miR が、組織特異的に発現分布しており、病気によりその発現量が変化するという知見の蓄積、さらには血液中において miR の検出がなされることなどを勘案すると、miR は組織間を移動して、別の細胞にも影響を与える可能性がある。そのため、本研究では、miR がエクソソームに包まれて細胞外に放出される可能性を、特に培養した中枢ニューロンを用いて解析する。

(2) 脳に豊富に存在する神経栄養因子である BDNF の発現量や、その機能的変化は、うつ病など、精神疾患の発症や病態と関係すると考えられている。そのため、BDNF と、ニューロン間で伝搬する miR の関係は興味深く、ニューロン間の伝達(コミュニケーション)手段の一つである可能性もある。そこで本研究では、シナプス可塑性に重要な BDNF で刺激することにより、特定の miR の発現の変化が引き起こされる可能性と、エクソソーム

を介してニューロン間を伝播する可能性の解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 生後 1 - 2 日齢のラット大脳皮質より初代培養ニューロンを作成し、3 日間血清培地(HS; Horse serum., および FBS; Fetal bovine serum., それぞれ 5%)にて培養を行った。その後、血清中に含まれるエクソソームの寄与を除外するため、無血清培地(Neurobasal, 2%B27, 2%L-glutamine)に置換し、培養を継続した。同様に、グリア細胞の影響を観察するため、大脳皮質より採取したアストログリアの純粋培養を行った(Numakawa et al., *BBRC* 2015)。

(2) BDNF 刺激を実施する場合、無血清培地に交換後 3 日目に、最終濃度 100ng/ml で投与を行った。その後、24 時間後に培地上清および細胞を回収した。さらに、別の栄養因子の働きの寄与を考え、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の miR 発現への作用も解析した。

(3) エクソソームの定量するために、ナノ粒子解析装置を用いた。まず、培地上清を遠心後にフィルターを通し(0.02 マイクロメートル)、細胞片や、エクソソームとされている 40 - 100nm よりも大きな分泌小胞の除去を行った。その後、超遠心(100,000xg, 70 min, 4 )によってエクソソームの単離を行った。この単離したエクソソームは、PBS での洗浄後、再び PBS に懸濁してカウントを行った。また、エクソソームの細胞間の移動を検出するため、エクソソームマーカー蛋白質と考えられている CD63 に GFP を融合させたコンストラクトを用いた。コンストラクトの培養ニューロンへの導入には、リポフェクション法を用い、導入の確認には蛍光顕微鏡による観察、および CD63 蛋白質の検出を行った。

(4) 単離エクソソームまたは回収した細胞の発現する miR は、リアルタイム PCR による定量を行った。また、分泌に関わる蛋白質の発現確認には、ウエスタン法を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 培養大脳皮質ニューロンを、BDNF で刺激し、その後、細胞外に放出されたエクソソームを回収し、その数における変化の解析を試みた。しかし、24 時間の BDNF 刺激において、実際にエクソソーム数をカウントする場合、およびエクソソームマーカーである CD63 の蛋白質の含有量を測定した場合のいずれにおいても、BDNF 刺激による変化は観察されなかった。細胞ライセートにおける

CD63 発現量にも顕著な差は観察されなかった。

(2)単離したエクソソームから RNA を抽出し、これまでの知見で、精神・神経疾患発症との関連が示唆されている miR1, 9, 16, 124a, 132, 134、および 206 などのリアルタイム PCR による定量を試みた。しかし、BDNF の無添加群(コントロール)では、これらの miR の検出が出来なかった。一方で、BDNF を添加した群では、上記の miR のうち、少なくとも 3 種類の検出に成功した(未発表)。このことは、BDNF はエクソソームの放出量には変化を与えないが、内容物の量(特異的な miRs の量)に影響を与える可能性を示している。

(2) 離れた位置に存在するニューロン間において、miR がエクソソームを介して伝搬する可能性を検証するため、培養ニューロンに CD63/GFP を発現させた。さらに、ニューロンの活動を変化させることで知られる BDNF 刺激も行った。培養 4-5 日目の細胞に対して、CD63/GFP の導入を行うと、エクソソームの産生に關する多胞性エンドソームと思われるような蛍光ラベルされた小胞が観察された。この蛍光小胞は、細胞体や樹状突起において見出された。その後、BDNF 刺激を行い、細胞外へ放出されたエクソソームを回収し、GFP を認識する抗体で検出を試みた。しかし、導入効率が 20 パーセント以下と低いためか、外来 CD63/GFP の検出には至らなかった。また、CD63/GFP を導入したニューロンでは、顕著な神経細胞死が誘導される傾向が見出され、これも刺激依存的な細胞外エクソソームの検出を困難にしている可能性があった。今後は、細胞の生存には影響しない他のエクソソームマーカーを指標にして、同様の実験を行うなどの検討が必要である。

(3) 脳においての miR の機能解析は、そのほとんどがニューロンを主眼においたものである。アルツハイマー病などの神経変性疾患と、脳特異的な miR の発現変化なども注目されるが、ニューロンではなくアストログリア由来の miR の変化が病態と関連している可能性もある。既に我々は、大脳皮質ニューロンにおいて、BDNF が miR-132 を増加させ、それは BDNF によるシナプス増加作用に密接に關係することなどを報告している(Numakawa et al., *Neurochem Int.* 2011)。一方で、グリア細胞では BDNF の受容体やその下流シグナルの活性が誘導されず、miR の発現にも効果がないことを確かめている。ところが、別の神経栄養因子である bFGF にはアストログリアにおける miR-132 の発現を増加させることが明らかになったため(Numakawa et al., *Neurosci Lett.* 2011)、新たにグリア細胞における miRs の働きも重要であると思われた。そこで、アストロサイトを純粋培養し、bFGF 添加における miR 発現変

動と、その果たす役割について解析した。その結果、bFGF(100 ng/ml, 24hours)は、測定を行った miR-132 および miR-134 の発現を有意に増加させたが、その増加の割合は、miR-134 においてさらに顕著であった。その miR-134 増加は用量依存的であり、bFGF 受容体の寄与を示唆していた。

アストロサイトでは、bFGF 以外にも生理的活性が報告されている栄養因子は多数存在する。しかし、我々の実験系では、BDNF のみならず、解析を試みた IGF-1, EGF, GDNF の投与における miR-134 の増加は観察されなかった。これは、bFGF/miR-134 には、特異的な機能がある可能性を示唆していた。そこで、これまでほとんど未知であった、アストログリア細胞における miR-134 の機能を解析することにした。

最初に、bFGF で誘導される細胞内シグナルを観察すると、ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) や PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt シグナルの活性化が確認できた。これらのシグナル阻害剤を bFGF と同時に投与すると、miR-134 の産生が著しく抑制された。一方で、miR-134 を細胞に強制発現させても、内在性の ERK や PI3K/Akt シグナルの活性化に変化がなかった。すなわち、bFGF は、受容体を活性化させた後、ERK および PI3K/Akt シグナル活性化を介して、miR-134 を増加させる可能性がある。興味深いことに、miR-134 の強制発現後、アストロサイトのマーカーである GFAP 蛋白質や、グルタミン酸トランスポーターの発現増加を発見した。アストログリアの細胞機能として、細胞外の興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の除去効果がよく知られている。そこで、bFGF 投与、または miR-132 を強制発現させたアストログリアの培養外液のグルタミン酸を定量したところ、予想通り、有意な濃度の減少が観察された。以上の実験結果は、bFGF には miR-134 の産生を利用してアストログリア細胞の成熟を促進する可能性を示していた(Numakawa et al., *BBRC*, 2015)

## 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 12 件)

Numakawa T, Nakajima S, Yamamoto N, Ooshima Y, Odaka H, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. "Basic fibroblast growth factor induces miR-134 upregulation in astrocyte for cell maturation." *Biochem Biophys Res Commun.* vol.456(1):465-470.(2015), 査読有  
doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.108.

Adachi N, Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Kunugi H. "New insight in expression, transport,

and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases.” World J Biol Chem. vol.5(4):409-428.(2014) Review, 査読有  
doi: 10.4331/wjbc.v5.i4.409.

Numakawa T, “Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases.” Neural Regen Res. vol.9(16):1506-1508. (2014) Review, 査読有  
doi: 10.4103/1673-5374.139474.

Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Adachi N, Furuta M, Odaka H, Kunugi H. “The role of brain-derived neurotrophic factor in comorbid depression: possible linkage with steroid hormones, cytokines, and nutrition.” Front Psychiatry. vol.5:136. (2014), 査読有  
doi: 10.3389/fpsy.2014.00136.

Odaka H, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, Nakajima S, Katanuma Y, Inoue T, Kunugi H. “Cabergoline, dopamine D2 receptor agonist, prevents neuronal cell death under oxidative stress via reducing excitotoxicity.” PLoS One vol.9(6):e99271.(2014), 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0099271.

Katanuma Y, Numakawa T, Adachi N, Yamamoto N, Ooshima Y, Odaka H, Inoue T, Kunugi H. “Phencyclidine rapidly decreases neuronal mRNA of brain-derived neurotrophic factor.” Synapse vol.68(6):257-265.(2014), 査読有  
doi: 10.1002/syn.21735.

Numakawa T, Matsumoto T, Ooshima Y, Chiba S, Furuta M, Izumi A, Ninomiya-Baba M, Odaka H, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. “Impairments in brain-derived neurotrophic factor-induced glutamate release in cultured cortical neurons derived from rats with intrauterine growth retardation: possible involvement of suppression of TrkB/phospholipase C- $\gamma$  activation.” Neurochem Res. vol.39(4):785-792.(2014), 査読有  
doi: 10.1007/s11064-014-1270-x.

Jalsrai A, Numakawa T, Ooshima Y, Adachi N, Kunugi H. “Phosphatase-mediated intracellular signaling contributes to neuroprotection by flavonoids of *Iris tenuifolia*.” Am J Chin Med. vol.42(1):119-130.(2014), 査読有  
doi: 10.1142/S0192415X14500086.

Suzuki N, Numakawa T, Chou J, de Vega S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi H, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Akazawa C. “Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal

adhesion kinase signaling.” FASEB J. vol.28(3):1386-1397.(2014), 査読有  
doi: 10.1096/fj.13-241034.

Furuta M, Numakawa T, Chiba S, Ninomiya M, Kajiya Y, Adachi N, Akema T, Kunugi H. “Estrogen, predominantly via estrogen receptor  $\alpha$ , attenuates postpartum-induced anxiety- and depression-like behaviors in female rats.” Endocrinology vol.154(10):3807-3816.(2013), 査読有  
doi: 10.1210/en.2012-2136.

Numakawa T, Nakajima S, Adachi N, Richards M, Kunugi H. “Neurotrophin Bdnf and Novel Molecular Targets in Depression Pathogenesis.” J Neurol Transl Neurosci. vol.1(3): 1021., 査読有  
<http://www.jscimedcentral.com/Neuroscience/index.php>

Numakawa T, “The Response of Glucocorticoids to Stress and Functional Alteration of Brain-Derived Neurotrophic Factor.” J Neurol Transl Neurosci. vol.1: 1004., 査読有  
<http://www.jscimedcentral.com/Neuroscience/index.php>

#### [学会発表] (計 25 件)

Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Chiba S, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, Kunugi H. “The mechanisms behind deficits in BDNF function after phencyclidine exposure” CSHA/NGF2014 Joint Conference on Nerve Growth Factor and Related Neurotrophic Factors: Emerging Concepts, New Mechanism, Novel Technologies 2014/6/23 ~ 6/27, Suzhou, PR China

Nakajima S, Numakawa T, Yamamoto N, Yoshiko O, Odaka H, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. “MicroRNA induction by basic fibroblast growth factor in pure astroglial cultures.” CSHA/NGF2014 Joint Conference on Nerve Growth Factor and Related Neurotrophic Factors: Emerging Concepts, New Mechanism, Novel Technologies 2014/6/23 ~ 6/27, Suzhou, PR China

Odaka H, Numakawa T, Yoshimura A, Adachi N, Nakajima S, Era T, Inoue T, Kunugi H. “Influence of chronic glucocorticoid exposure on proliferation and differentiation of rat neural stem cells in vitro” 熊本医学・生物科学国際シンポジウム, 2014/9/4 ~ 9/5, 熊本市医師会館 (熊本県)

Yoshimura A, Numakawa T, Odaka H, Tamai Y, Era T, Kunugi H. “The effect of IL-6 on expression of microRNAs in rat embryonic neural stem cells during their differentiation.” 熊本医

学・生物科学国際シンポジウム 2014/9/4～9/5,  
熊本市医師会館(熊本県)

沼川 忠広、中島 進吾、山本 宣子、大島 淑子、小高 陽樹、橋戸 和夫、安達 直樹、功刀 浩 “アストログリア細胞においてbFGF投与で増加したマイクロRNAの機能的役割” 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会 合同年会, 2014/9/29～10/1, 奈良県文化会館/奈良県新公会堂(奈良県)

中島 進吾、沼川 忠広、安達 直樹、功刀 浩 “経口グルコース負荷後のERKの変化” 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会 合同年会, 2014/9/29～10/1, 奈良県文化会館/奈良県新公会堂(奈良県)

吉村 文、沼川忠広、中島進吾、安達直樹、川又理樹、落谷孝広、功刀 浩、玉井淑貴 “Possible of CD63 in synaptic function of rat cortical neurons.” 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会 合同年会, 2014/9/29～10/1, 奈良県文化会館/奈良県新公会堂(奈良県)

安達 直樹、沼川 忠広、中島 進吾、大島 淑子、小高 陽樹、片沼 祐介、功刀 浩 “グルココルチコイドによる脳由来神経栄養因子(BDNF)の細胞内輸送制御”, 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会合同年会, 2014/9/29～10/1, 奈良県文化会館/奈良県新公会堂(奈良県)

小高 陽樹、沼川 忠広、安達 直樹、大島 淑子、中島 進吾、片沼 祐介、井上 貴文、功刀 浩 “培養大脳皮質ニューロンに対するカベルゴリン(ドーパミンD2受容体アゴニスト)の神経保護効果の解析”, 第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会合同年会, 2014/9/29～10/1, 奈良県文化会館/奈良県新公会堂(奈良県)

片沼祐介、沼川忠広、安達直樹、山本宣子、大島淑子、小高陽樹、井上貴文、功刀浩 “フェンサイクリジン短期曝露は大脳皮質ニューロンの BDNF mRNA 発現を急速に低下させる” 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014, 2014/9/11～9/13, パシフィコ横浜(神奈川県)

Yamamoto N, Numakawa T, Nakajima S, Ooshima Y, Odaka H, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. “Glial miR expression following basic fibroblast growth factor application in astrocytes” 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014, 2014/9/11～9/13, パシフィコ横浜(神奈川県)

Wakabayashi C, Numakawa T, Ooshima Y, Hattori K, Kunugi H. “High fat diet-induced

deficiency of prepulse inhibition in mice” 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014, 2014/9/11～9/13, パシフィコ横浜(神奈川県)

Ooshima Y, Numakawa T, Matsumoto T, Chiba S, Furuta M, Izumi A, Ninomiya-Baba M, Odaka H, Hashido K, Adachi N, Kunugi H. “Decreased release of neurotransmitter induced by BDNF in cultured cortical neurons from IUGR(intrauterine growth retardation) rats” 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014, 2014/9/11～9/13, パシフィコ横浜(神奈川県)

中島 進吾、沼川 忠広、安達 直樹、功刀 浩 “大脳皮質ニューロンにおける GLP-1 と BDNF との相互作用 The interaction of BDNF and GLP-1 in cortical neurons” 第 86 回日本生化学学会大会, 2013/9/11～13, パシフィコ横浜(神奈川県)

Numakawa T, “Stress regulation of glucocorticoids and role of neurotrophic factor in neurons: Implications for depression.” 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013/6/23～27, Kyoto, Japan(招待講演)

Adachi N, Numakawa T, Ooshima Y, Kunugi H. “Glucocorticoids affect the intracellular transport of BDNF in cortical neurons” Neuro2013, 2013/6/20～23, 国立京都国際会館, 京都

Okamoto A, Numakawa T, Adachi N, Masuo Y, Kunugi H. “Aldosterone enhanced release of neurotransmitter in cultured neurons” Neuro2013, 2013/6/20～23, 国立京都国際会館, 京都

Odaka H, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, Inoue T, Kunugi H. “Protective effect of cabergoline, a dopamine D2 receptor agonist, on cultured neurons.” Neuro2013, 2013/6/20～23, 国立京都国際会館, 京都

Numakawa T, Adachi N, Kumamaru E, Ooshima Y, Kunugi H. “Possible involvement of shp2 in an influence of glucocorticoid on neurotrophin-dependent synapse regulation” Neuro2013, 2013/6/20～23, 国立京都国際会館, 京都

Katanuma Y, Numakawa T, Adachi N, Inoue T, Kunugi H. “The Effect of Phencyclidine on

BDNF mRNA Expression in Rat Cultured Cortical Neurons.” Neuro2013, 2013/6/20 ~ 23, 国立京都国際会館, 京都

⑳ Noriko Yamamoto, **Numakawa T.**, Ooshima Y, Kishi S, Hashido H, Adachi N, Kunugi H. “Fibroblast growth factor-dependent upregulation of microRNAs in cultured neuronal and glial cells.”, Neuro2013, 2013/6/20 ~ 23, 国立京都国際会館, 京都

㉑ Ooshima Y, **Numakawa T.**, Adachi N, Kunugi H. “Possible change in neurotrophin function in decreased weight rats model.” Neuro2013, 2013/6/20 ~ 23, 国立京都国際会館, 京都

㉒ Suzuki N, **Numakawa T.**, Chou J, de Vega S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi H, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, Akazawa C. “Teneurin-4 Positively Regulates Neural Cell Process Formation and Synaptogenesis” Neuro2013, 2013/6/20 ~ 23, 国立京都国際会館, 京都

㉓ **沼川忠広** : “Glucocorticoid stress, neurotrophin, and pathogenesis of psychiatric disorders”, 熊本大学リエゾンラボ研究会/リーディングプログラム: HIGO 最先端研究セミナー, 熊本大学, 熊本, 2013年11月20日(招待講演)

㉔ **沼川忠広** : 「神経障害におけるストレスおよび栄養因子 BDNF の役割について」蛋白研リトリート, 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場, 兵庫, 2013年11月25日(招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

ありません

取得状況(計0件)

ありません

〔その他〕  
ありません

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沼川 忠広 (NUMAKAWA, Tadahiro)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部 客員研

## 究員

研究者番号: 40425690

### (2) 研究分担者

ありません

### (3) 連携研究者

橋戸 和夫(HASHIDO, Kazuo)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 ラジオアイソトープ管理室 室長

研究者番号: 70270650