

＜ホットトピックス (2)-1＞

マイクロ RNA と神経変性疾患

祖父江 元¹⁾

要旨：マイクロ RNA (microRNA; miRNA) は標的遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) に結合することで、遺伝子の発現抑制をおこなう。こうした遺伝子発現制御が癌や神経変性などの病態を修飾することが示されている。筆者らは球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) のマウスモデルにおいて発現が上昇している miRNA として miR-196a を同定し、それをアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターをもちいてマウスモデルに遺伝子導入することによって、病因蛋白質である変異アンドロゲン受容体の発現を抑制し、運動ニューロン変性を抑止できることを明らかにした。内因性の核酸を利用した治療法として、今後 miRNA の他の疾患への応用が期待される。

(臨床神経 2013;53:942-944)

Key words：マイクロ RNA, アデノ随伴ウイルスベクター, 球脊髄性筋萎縮症, 運動ニューロン

はじめに

21 世紀に入りヒトやマウスでの大規模なゲノム解析が進む中で、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の存在が明らかとなった。マイクロ RNA (microRNA; miRNA) はウイルス、植物、動物にいたるまで多くの生物種間で高度に保存される約 22 塩基長の ncRNA の 1 種である¹⁾²⁾。miRNA の役割は主に、標的遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) の 3'UTR (untranslated region) に塩基相補的に結合することで、遺伝子の発現抑制をおこなう³⁾⁴⁾。現在、ヒトでは 1,000 種類以上の miRNA が確認され、それらは全遺伝子の半数以上を標的にしていると予想されている。このように、個々の miRNA は数百の遺伝子の発現を直接抑制し、細胞の分化や増殖、免疫、発癌、変性など多様な生命現象に関与していることが報告されている。また、最近の研究から、特定の miRNA が病態を修飾する強力な因子となることが示され、miRNA の代謝経路を標的とする治療アプローチの可能性が注目を集めている^{3)~8)}。

miRAN を介した球脊髄性筋萎縮症の治療

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は遺伝性の神経変性疾患のひとつであり、アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子 exon 1 の CAG リピート数が異常伸長するポリグルタミン病でもある。SBMA はアンドロゲン依存性に表現型を示し、四肢の筋萎縮、筋力低下および球症状を主徴とする。これらの症状は、異常 AR 蛋白がテストステロン依存性に神経細胞内に不溶化凝集体を形成し神経変性をきたすことで出現する機序が知られている。SBMA モデルマウスは AR 遺伝子 exon 1 の CAG リピー

ト数が 97 に異常伸長したモデルであり、生化学的および病理学的な検討において SBMA の病態を反映していることが確認されている。一方、コントロールマウスの CAG リピート数は 24 であり野生型のマウスと比較したばあいにも特異的な神経症状はみとめられない。はじめに、コントロールマウスと比較して病態進行期の SBMA モデルマウス脊髄において高発現をみとめる miRNA をマイクロアレイ解析により同定した。このアレイ解析で、コントロールマウスと比較して病態進行期の SBMA モデルマウス脊髄において 2 倍以上の発現上昇を示したものは miR-196a, miR-196b, miR-496, miR-323-3p, miR-29b* であった⁹⁾。変異型 AR (AR-97Q) を一過性強制発現させる培養細胞モデルにおいて、これらの miRNA のうち miR-196a と miR-196b は AR mRNA と AR 蛋白の発現レベルを抑制した。培養細胞モデルに使用した AR-97Q は AR mRNA の cDNA をもとに作成したプラスミド DNA 由来であるため、これらから合成される AR mRNA は 3'UTR を有していない。このことにより、miR-196a や miR-196b が直接的な相補鎖によって AR mRNA に作用することはない。次に、actinomycin-D をもちいた RNA stability assay をおこなったところ、miR-196a および miR-196b は AR mRNA の安定性を減弱し分解に導いていることが判明した。さらに、これらの抑制効果は野生型の AR-24Q においてもみられた。この結果より、miR-196a と miR-196b は AR mRNA の安定化に寄与する因子の発現を抑制することで AR mRNA の分解を導いているものと推測した。バイオインフォマティクスのプログラム (TargetsScan 6.0) 上、miR-196a および miR-196b の標的となりうる mRNA はそれぞれ 200 種類近く存在する。今回は、これらの mRNA の中で miR-196a と miR-196b に共通の相補鎖を有する CUGBP2, Elav-like family member 2 (CELF2) に着目した。培養細胞モデルにおいて、siRNA により CELF2

¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科 [〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65]
(受付日：2013 年 5 月 30 日)

の発現をおさえると AR mRNA の分解が亢進し、AR mRNA や AR 蛋白の発現も同時に抑制された。また、CELF2 の一過性強制発現によって AR-97Q は mRNA レベルで発現上昇をみとめた。さらに、RNA stability assay によって AR mRNA の安定性には CELF2 が必要であることが判明した。CELF2 の AR mRNA および蛋白に対する作用は野生型の AR24Q に対しても同様に観察された。上記の結果をふまえ、CELF2 が AR mRNA のどの領域に作用するかを検討した。AR mRNA exon 1 内の CAG リピートはヘアピン構造をとるが、これに連続したくりかえし配列 (CUGCUGCUG) に注目し、このくりかえし配列を欠損した transgene (Δ CUG-AR-24Q および Δ CUG-AR-97Q) ならびに CAG リピートを欠損した transgene (AR-0Q) を作成した。CELF2 の一過性強制発現により AR-0Q は mRNA レベルで発現上昇をみとめたが、 Δ CUG-AR-24Q および -97Q はいずれも発現上昇がみられなかった。また、抗 CELF2 抗体による免疫沈降を併用した RT-PCR により CELF2 と CUGCUGCUG 配列の binding affinity を証明した。以上より miR-196a および -196b は、AR mRNA の安定化に寄与している CELF2 の発現を抑制することで間接的に AR mRNA の分解を促進する機序が導き出された。

次に、in vivo における CELF2 発現抑制の効果を検討するために、miR-196a と Green fluorescent protein (GFP) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-miR-196a) を作成し、5 週齢の SBMA モデルマウスの下肢筋肉に投与した。筋注された AAV は血行性に全身へ播種し、効率よく中枢神経系に感染し遺伝子導入された。遺伝子導入は GFP の発現により確認をおこなった。AAV-miR-Mock と比較して、AAV-miR-196a を投与された SBMA モデルマウスでは表現型 (運動機能、生存率、体重増加) の有意な改善がみられ、病理学的検討においても異常 AR の蓄積や神経原性筋萎縮ならびに神経変性を反映した反応性グリオシスにおいて有意な改善をみとめた。さらに、miR-196a による AR mRNA ならびに AR 蛋白の発現抑制効果が SBMA 患者の線維芽細胞をもちいた実験でも同様にみられることを証明した。SBMA 患者の脊髄をもちいた検討では、疾患コントロールと比較して miR-196 と miR-196b の発現が SBMA 患者の脊髄において上昇し、CELF2 mRNA の発現が低下していることをみいだした。

今後の展望

様々な神経変性疾患において miRNA の発現パターンの変化が報告されており、少なくともその一部は免疫や酸化ストレスの制御など神経変性の病態に深く関与していることが報告されている。筋萎縮性側索硬化症などの疾患においても、疾患特異的に発現上昇している miRNA の発現を誘導することで神経変性が抑制されることが知られており¹⁰⁾、安全かつ効率的なデリバリーシステムと組み合わせることにより神経変性疾患の有望な治療戦略となりえると考えられる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文献

- 1) Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, et al. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 2008;456:130-134.
- 2) Guttman M, Donaghey J, Carey BW, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 2011;477:295-300.
- 3) Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:126-139.
- 4) Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376-385.
- 5) Somel M, Liu X, Khaitovich P. Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:112-127.
- 6) Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704-714.
- 7) Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10:389-402.
- 8) Qureshi IA, Mehler MF. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:528-541.
- 9) Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med* 2012;18:1136-1141.
- 10) Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009;326:1549-1554.

Abstract**MicroRNA in neurodegenerative disorders**Gen Sobue, M.D.¹⁾¹⁾Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine

MicroRNAs (miRNAs) bind to the 3'-untranslated region of mRNA, and thereby suppress the gene expression. Recent studies suggest that miRNAs modify the pathogenesis of cancer and neurodegeneration. Our study demonstrated that the expression levels of miR-196a is increased in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), a neurodegenerative disease caused by the expansion of polyglutamine in androgen receptor (AR). In cultured neuronal cells, miR-196a decayed the mutant AR mRNA via silencing CUG triplet repeat RNA binding protein 2, a potent miR-196a targeting mRNA, which contributed to stabilize the mutant AR mRNA. Adeno-associated virus vector-mediated delivery of this miRNA attenuates the expression of the mutant AR, resulting in the mitigation of motor neuron degeneration in the SBMA mice. Introduction of miRNA appears to be a novel therapeutic strategy for devastating neurodegenerative diseases.

(Clin Neurol 2013;53:942-944)

Key words: microRNA, Adeno-associated virus vector, Spinal and bulbar muscular atrophy, motor neuron
