

神経系前駆細胞分化に関わる miRNAの探索と機能解析



近藤 亨

愛媛大学 プロテオ医学研究センター 幹細胞分化制御部門 教授
理化学研究所 神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター
分化転換研究チーム チームリーダー

約2万個あるとされるヒトの遺伝子は、スプライシングの機構によって、何通りにも使い回されていることが知られる。一方で、最近になって、21~22塩基対ほどのRNA断片(マイクロRNA:miRNA)にも、遺伝子に干渉することで発現量を調節する機能があることがわかり、注目を集めている。愛媛大学 プロテオ医学研究センター 幹細胞分化制御部門教授で、理化学研究所 神戸研究所 発生・再生科学総合研究センター 分化転換研究チームのチームリーダーを兼任する近藤 亨博士は、高等生物の中樞神経系を構成する細胞の一つ、オリゴデントロサイトを対象にした研究を続け、その前駆細胞(オリゴデントロサイト前駆細胞:OPC)が、ある一定の条件下において神経幹細胞としてふるまうことを明らかにしてきた。さらに、OPCで発現するmiRNAにも着目し、チップによる発現解析と機能解析によって、オリゴデントロサイトへの分化機構の一端を明らかにした。

オリゴデントロサイト前駆細胞とは

私たちの中枢神経は、おおよそニューロンとグリア細胞から構成されている。ニューロンは、電気的な活動とシナプス結合により、脳の情報処理回路の中心として機能する。グリア細胞はさらにオリゴデントロサイトとアストロサイトに分けられ、ニューロンの生存や機能の維持のためにはたらくと考えられている。このうちオリゴデントロサイトは「ミエリン」とよばれる薄いシート状の構造物を作り出し、このシートを神経の軸索に何重にも巻き付けることで軸索を部分的に絶縁している。こうすることで、軸索内を伝わる電気信号の速度が、飛躍的に高められる。

一方、最近になって、グリア細胞の前駆細胞が「神経幹細胞」として、ニューロンやグリア細胞を生み出すことが明らかにされている。たとえば近藤博士は、視神経に存在するOPCを対象に、「さまざまな成長因子の添加や除去により、オリゴデントロサイトへ分化すること」、「血清あるいは骨形成因子の存在下でOPCを培養すると、多能性幹細胞や組織幹細胞と同様に、*Id*を含む特殊な遺伝子群を発現するようになること」、「アストロサイトに分化したOPCを神経幹細胞と同様の条件下で培養すると、脱分化をおこし、さらに特定の分化誘導因子を加えるこ

とによってニューロンへと分化すること」などを突き止めている。

「私たちは、OPCの分化が異常になると多発性硬化症や悪性度の高いグリオーマの発症につながることも明らかにしています」。そう話す近藤博士は、悪性脳腫瘍を含むさまざまながん細胞株に幹細胞様のがん細胞が存在することも突き止めてきており、こうした幹細胞を維持する機構や分化転換機構などの解明が、新たな治療や創薬に結びつくと考えている。

miRNAと幹細胞と分化

「OPCのオリゴデントロサイトへの分化誘導には、さまざまなシグナル伝達が必要とされ、OPCは、成熟OPC→未熟オリゴデントロサイト→成熟オリゴデントロサイトと、段階的に分化していきます。オリゴデントロサイト分化に関わるおおよそのシグナル伝達因子のネットワークは明らかにされてきましたが、新たな役者を見つけるのは困難な状況でした」。そう話す近藤博士は、遺伝子ではなく、遺伝子の発現調節に関与するmiRNAに着目した。1993年に線虫で発見されたmiRNAは、その後、脊椎動物を含む多くの種でみつきり、種を超えて広く保存されているものも多い。ヒトではこれまでに721種のmiRNAが知られており、今後の解析によってまだまだ増えると考えられ

ている(タンパク質をコードする遺伝子の約3割の発現が、miRNAによって制御されているとの予測もある)。

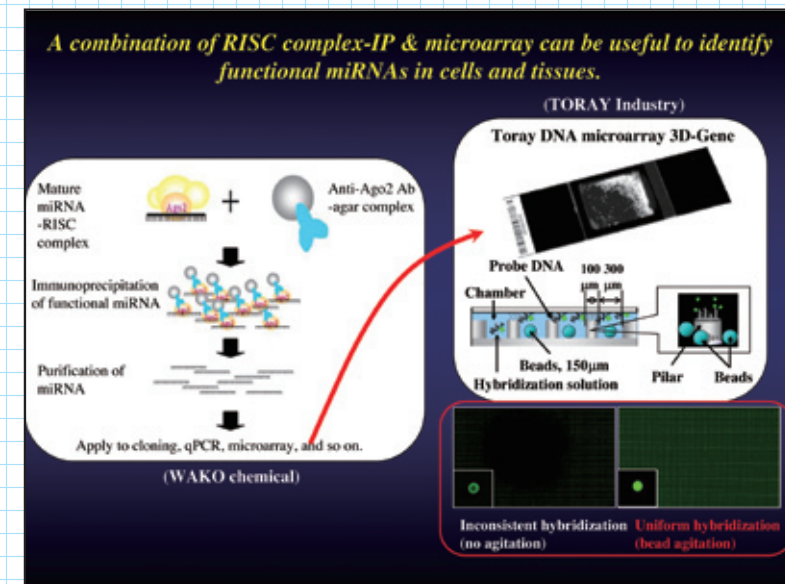
逆に考えると、miRNAの制御異常がさまざまな病気につながるもい、実際にはがんや神経疾患などで、具体的なmiRNAの異常が報告されるようになってきている。「たとえば脳腫瘍では、miR26やmiR17などで、神経疾患ではmiR19やmiR101などで、発現が異常になっていることが報告されています」と近藤博士。

OPCで発現する miRNAの探索

こうした知見を踏まえ、近藤博士はマウスの視神経から精製したOPCを用い、分化誘導過程でのmiRNAの発現解析を行った。用いたのは、3D-Gene®よばれる超高感度のチップ。黒色の樹脂を基盤とする3D-Gene®の表面には柱状の立体構造が成形されており、その上面に発現遺伝子を検出するためのDNAプローブが固定されている。このことにより、大幅なバックグラウンドノイズの減少が達成できているという。さらに、miRNAを反応させる際に、柱間に配置したマイクロビーズで攪拌することで、反応性を向上させるといった工夫も施されており、感度、再現性、定量性が、従来のチップよりも大幅に改善されている。

「解析の結果、オリゴデントロサイトにくらべOPCでは、miR15bやmiR25など39種のmiRNAの発現が有意に亢進しており、miR129-3aやmiR175などの46種のmiRNAが有意に抑制されていました」と近藤博士。続いて、OPCで特異的に発現が亢進する2種のmiRNA(miRX、miRYと仮称)について、これらの恒常的な発現が細胞分化を抑制することを確認した。一方で、これらのmiRNAがどのような遺伝子の発現を抑制しているのかについても、既存のデータベースで検索し、*IGF1*やそのレセプターをターゲット遺伝子の候補として絞り込んだ。

「ここまでの結果を踏まえ、同定したmiRNAにより制御を受ける遺伝子群について、改めて3D-Gene®を用い



RISC複合体の免疫沈降と3D-Gene®の組み合わせによる機能性miRNAの同定

て解析を行ったところ、実際のターゲット遺伝子として、*IGF*とその関連遺伝子を特定することができました」。そう話す近藤博士は、miRYが22番染色体上にある「多発性硬化症の原因遺伝子」の近傍にあること、オリゴデントロサイトの分化に必須とされる2種のタンパク質の発現にも関与していることなども明らかにしているという。

近藤博士は、今後の研究や目標については次のように述べている。「miRNAが生命機能、および疾患に深く関わっていることが報告されている現在、短時間で効率よく機能的なmiRNAを同定できる手法が求められています。今回の研究方法は、まさにこの要求に応える1つのモデルになったと考えています。現在、私たちは、同様の方法を用いて、OPCの幹細胞化やがん化といった、さまざまな細胞運命の決定を制御している新規miRNAの同定を試み始めています」。

このように、miRNAは「影の立役者」として、遺伝子の発現に大きく関わっていることがわかってきた。急速に展開されつつある今回のような研究は、発生や分化という生物学の根源的なテーマに一石を投じるだけでなく、がんや神経疾患などにおける新たな治療の可能性を開き、幹細胞やiPS細胞を用いた再生医療を構築するための重要な手がかりとなると期待される。

西村尚子/サイエンスライター