福島県立医科大学学術成果リポジトリ

FUKUSHIMA MEDICAL UNIVERSITY

Astrocyte-derived exosomal miR-200a-3p prevents MPP+-induced apoptotic cell death through down-regulation of MKK4

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2020-04-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: SHAKESPEAR, NORSHALENA BINTI メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000303

論　文　内　容　要　旨

氏名（しめい）	のーしゃりな　びんてぃ しぇいくすぴあ NORSHALENA BINTI SHAKESPEAR
学位論文題名	Astrocyte-derived exosomal miR-200a-3p prevents MPP^+-induced apoptotic cell death through down-regulation of MKK4 （アストロサイト由来エクソソーム miR-200a-3p は MKK4 発現の抑制を介して MPP^+誘発性アポトーシス神経細胞死を抑制する）

【目的】グリア細胞であるアストロサイトは中枢神経細胞の機能を維持する重要な役割を持つ。近年、アストロサイトが放出する細胞外小胞エクソソームが神経細胞の機能を直接制御することが報告されている。一方、神経細胞アポトーシスシグナル伝達系として MKK4−JNK 系が重要な役割を果たすことが知られている。そこで本研究では、神経毒 MPP^+誘発性細胞死モデルにおいて、アストロサイト由来エクソソームが神経細胞死に与える効果を明らかにし、その機能を担う microRNA（miRNA）を同定することを目的とした。

【方法】マウス新生児脳よりアストロサイト初代培養細胞を確立した。アストロサイト培養の培地よりアストロサイト由来エクソソーム（ADEXs）を超遠心法で回収した。同様に MPP^+刺激後に放出されたアストロサイト由来エクソソーム（MPP^+-ADEXs）を調製した。SH-SY5Y 細胞培養を用いてアポトーシスを評価した。その際、caspase-3 活性化を指標とした。正常 ADEXs および MPP^+-ADEXs に含まれる miRNA については small RNA シークエンシング法で解析し顕著に変動する miRNA を同定した。同定した miRNA の機能をルシフェラーゼアッセイおよび MPP^+誘発性細胞死モデルを用いて解析した。

【結果】正常アストロサイト由来 ADEXs が MPP^+誘発性 caspase-3 活性化を顕著に抑制し、MKK4 のタンパク質及び mRNA 発現を抑制した。miRNA シークエンシングの比較で、MPP^+-ADEXs における miR-200a-3p の発現が最も著明に低下することが判明した。miRNA ターゲット予測解析とルシフェラーゼアッセイから miR-200a-3p が MKK4 mRNA の 3'-非翻訳領域に特異的に相互作用し MKK4 発現を制御することが示唆された。実際、miR-200a-3p を添加した SH-SY5Y 細胞において MKK4 のタンパク質及び mRNA 発現が抑制され、MPP^+誘発性細胞死も有意に抑制された。

【考察】神経細胞アポトーシスにおいて MKK4−JNK シグナル伝達系が重要な役割を果たす。本研究でアストロサイト由来エクソソーム、特にそれに含まれる miR-200a-3p が MKK4 発現を抑制することで、MPP^+投与で誘起される JNK および caspase-3 活性化を減弱させアポトーシスが抑えられたと考えられる。miRNA は複数のターゲットを持つことが知られている。今後、MKK4 以外の miR-200a-3p ターゲットと神経細胞保護作用との関連性について研究を進めたい。また、MPP-ADEXs 由来 miR-200a-3p が著しく低下したことも興味深い。どのような条件でアストロサイト miR-200a-3p 産生レベルが変化するのか詳細に検討したい。

【結論】アストロサイト由来エクソソームが MPP^+誘発性細胞死に保護作用を示すことが明らかになった。エクソソーム中の miR-200a-3p が MKK4 発現を抑制することにより、MKK4-JNK シグナル伝達系を制御し、結果として、caspase-3 活性化及び細胞死を抑制すると考えられる。

※日本語で記載すること。１２００字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

令和２年２月５日

大学院医学研究科長様

　下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏名　ノーシャリナ　ビンティ　シェイクスピア
所属　生体物質研究部門

学位論文題名
Astrocyte-derived exosomal miR-200a-3p prevents MPP+-induced apoptotic cell death through down-regulation of MKK4
アストロサイト由来エクソソーム miR-200a-3p は MKK4 発現の抑制を介して MPP+誘発性アポトーシス神経細胞死を抑制する

　アストロサイトが放出するエクソソームが中枢神経細胞の機能維持に関与する報告がこれまでなされてきたが、本研究は、アストロサイト由来エクソソーム及びエクソソーム内に存在する microRNA が、神経細胞死に与える影響を明らかにする目的で行われた。正常マウス脳アストロサイト由来エクソソーム（ADEXs）と神経細胞アポトーシス誘発物質である MPP+で処理したアストロサイト由来エクソソーム（MPP+-ADEXs）を調製し、MPP+誘発性アポトーシス神経細胞死への効果を調べたところ、ADEXs のみに細胞保護作用が見られることを明らかにした。次に、それらの効果の違いが、エクソソーム内に存在する miRNA のうち、miR-200a-3p の違いであることを明らかにした。更に、miR-200a-3p を SH-SY5Y 細胞に投与したところ、MKK4 発現を抑制し、MPP+に誘発された細胞死も抑制することを明らかにした。これらの結果より、アストロサイト由来エクソソーム miR-200a-3p は MKK4 発現の抑制を介して MPP+誘発性アポトーシス神経細胞死を抑制することが本研究により示された。これらの結果はアストロサイトの細胞保護作用における新しメカニズムを示唆するものである。別紙に示すとおり、学位論文初稿及び令和元年１２月１７日に開催された審査会での発表に対する審査委員のコメントについては的確に修正され、本委員会は申請論文が本学医学博士授与に値するものと判断した。

論文審査委員	主査	細胞統合生理学講座	挾間　章博
	副査	生化学講座	苅谷　慶喜
	副査	生体機能研究部門	加藤　成樹