

## 2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>老化関連 miRNA の制御によるオルガネラ・リニューアルの解明</b>
キーワード	① 老化、② miRNA、③ オルガネラ・リニューアル

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ホウリ ケイ 法里 慧
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	近畿大学医学部麻酔科学教室 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	近畿大学医学部麻酔科学教室 医学部講師
プロフィール	2013年3月に近畿大学医学部を卒業し、2年間の初期研修を経て、2015年4月から現所属である近畿大学医学部麻酔科学教室に着任した。2022年3月に近畿大学大学院医学研究科医学系にて博士課程を修了している。 現在は麻酔科医として臨床業務に従事する傍ら、医学系研究に取り組んでいる。

### 1. 研究の概要

申請者は、申請時に決めた研究課題よりもさらに、医師という立場から日常診療に即した研究課題に特化することとした。

脳血管障害は脳血管の狭窄や閉塞により起こり、脳細胞のダメージや老化につながる。脳細胞のダメージには酸化ストレスが蓄積することは証明されているが、その詳細なメカニズムは解析されていない。

申請者は神経芽細胞腫とグリア細胞腫のハイブリッド細胞である NG108-15 (Merck KGaA, Germany) を用い、脳虚血状態で見られる低酸素状態、無血糖状態を培養条件から脳虚血モデルとして構築した。その培養条件による NG108-15 への細胞障害を証明し、酸化ストレスの蓄積やメカニズムの解明を計画した。

### 2. 研究の動機、目的

申請者は、加齢に関して酸化ストレスの発生や蓄積に着目し、研究してきた経緯がある。酸化ストレスの蓄積メカニズムには、miRNA (遺伝子の発現を抑制する効果を持つ非常に短い塩基の一本鎖 RNA) が関与していることを証明した。申請者は、マウスから採取した老化した骨髄間葉系幹細胞を用いて、加齢による細胞内のオルガネラ変化に関して研究していた。しかし今後も間葉系幹細胞を用いた基礎研究を行うよりも、自身の医師という立場から臨床現場に即したテーマに特化した方が研究の実現可能性や今後の医学の発展への貢献度が高いのではないかと考えた。

そこで脳血管の狭窄や閉塞から起こる脳虚血状態により酸化ストレスが蓄積し、脳細胞のダメージや老化が促進するメカニズムを解明することを本研究の目的とした。以前の研究成果も合わせ、脳細胞で見られる酸化ストレスの蓄積によりオートファジーなどの適切な細胞内小器官の処理機構の機能低下が起こり、劣化した脳細胞で発現が上昇する miRNA が重要な分子になっていると仮定した。

### 3. 研究の結果

#### I) 神経細胞の脳虚血状態モデルの構築

本研究は細胞レベルでの脳虚血状態を構築するため、マウス神経芽細胞腫とラットグリオーマ細胞のハイブリッド細胞である NG108-15 を使用した。

細胞増殖サイクルを把握するため、 $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$  の濃度で細胞培養を行った (21% $\text{O}_2$ 、5% $\text{CO}_2$ 、37°C、培地 10%FBS Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM))。結果より、播種後 6 時間から最も細胞増殖が盛んであることが予測された。

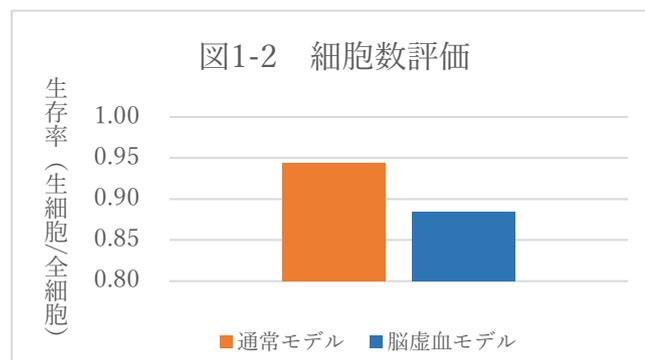
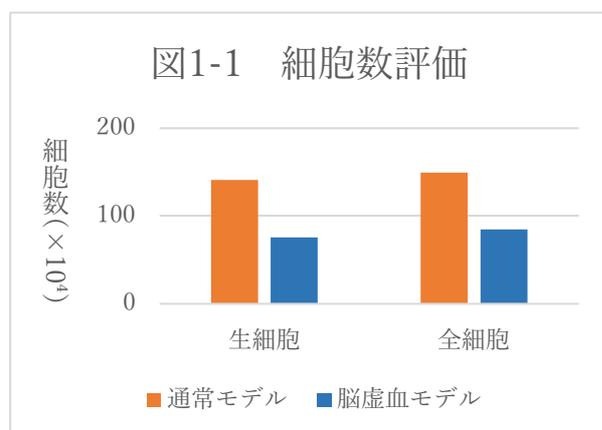
In vivo における脳虚血状態では、脳細胞レベルでは低酸素状態となり、血流の途絶から低栄養、低血糖状態にさらされると考えられる。また過去の文献も基にし、本研究での脳虚血モデルとして培養条件をブドウ糖除去した培養液を用い 1%酸素、5% $\text{CO}_2$ 、37°C の環境下で培養を行うこととした。

播種時に①5%ブドウ糖含有の DMEM (DMEM, high glucose, gibco) で培養した通常モデル (21% $\text{O}_2$ 、5% $\text{CO}_2$ 、37°C 培養) と②ブドウ糖除去した DMEM (DMEM, no glucose, gibco) で培養した脳虚血モデル (1% $\text{O}_2$ 、5% $\text{CO}_2$ 、37°C 培養) の 2 群に分け、播種後 6 時間の細胞数評価、細胞障害性の評価を行った。

#### II) 細胞数評価

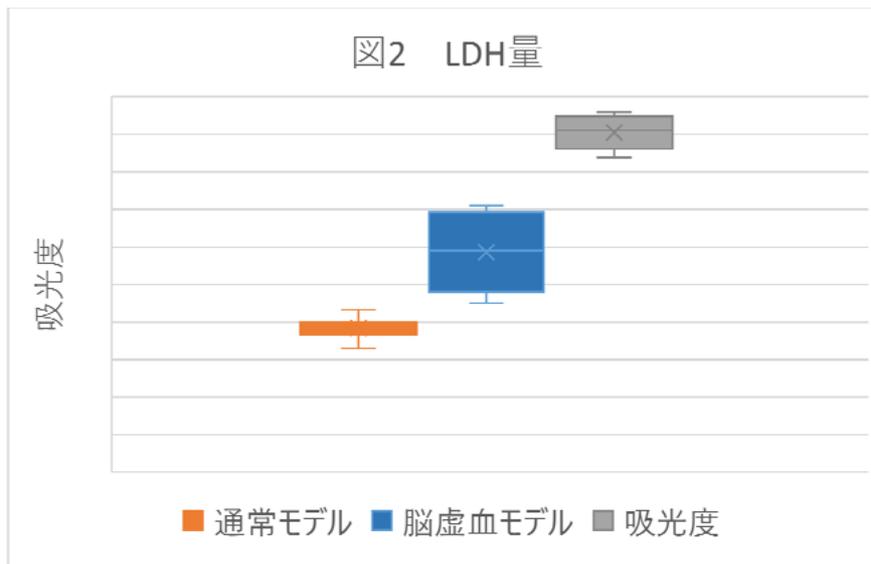
①通常モデルと②脳虚血モデルにおいて、細胞数評価を行った。方法としては、播種後 6 時間に各群それぞれ細胞を回収し、トリパンブルー (Trypan Blue Solution, 0.4% Thermo Fisher) を用いて生細胞数と総細胞数、生存率を評価した。

結果は、①通常モデルは②脳虚血モデルに比べ生細胞が多く、生存率も高いことが分かった。(図 1-1、1-2)



#### III) 細胞毒性評価

本研究での細胞毒性は、細胞膜障害ととらえ細胞から培地中に排出された LDH 量を LDH Assay Kit (Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST, Dojindo) を用いて測定した。吸光度はモノクロメータータイプ吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Scientific Multiskan GO) を用いて 490nm の吸光度を測定した。結果としては、②脳虚血モデルのほうが①通常モデルに比べ、LDH の放出が多かった。これにより、脳細胞において②脳虚血モデルのような低酸素・ブドウ糖除去した条件下では細胞膜障害が引き起こされることが証明された。(図 2)



#### 4. 研究者としてのこれからの展望

昨年度のみ研究成果としては、NG108-15 への細胞障害の詳細なメカニズムまでは証明することが出来なかった。その主な原因としては、LDH アッセイに使用したプレートリーダーの故障により修理に多くの時間を費やしてしまったことにある。また日常診療との兼ね合いから、研究にエフォートを割けなかったことも原因と考える。

しかし、申請者は以前より継続している研究から miRNA の計測やウエスタンブロット法によるタンパク質の抽出などや RNA 抽出などには精通しているため、本研究の過程は今後スムーズに遂行されると考える。

また、本研究を通して細胞レベルでの酸化ストレスの蓄積により細胞小器官の処理機能の低下が起こり、そのメカニズムとして miRNA が関与していることが証明されれば、今後は脳血管障害のある患者からサンプルを採取し同様の反応が得られているのか in vivo 研究へ移行していくことも計画している。

医学は現状未知な部分もまだ多く残っている。今後も臨床現場で働く医師として、日常診療で得る疑問や未知な点を解決すべく研究テーマを広げていくつもりである。また、今までの基礎研究の知識や技術も活用し、臨床のテーマに即した内容も基礎研究の目線からもアプローチする所存である。

#### 5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は本研究にご支援いただき、心より御礼申し上げます。私学事業団の女性研究者奨励金を獲得したことにより、研究者として自身の研究が今後の医学の発展につながっていくには何を研究テーマにすべきか、改めて考えるきっかけとなりました。実際、脳血管障害による細胞障害をテーマに局限させることで集中的に研究を実行することが出来ました。

今回の私の結果は予想していた物には程遠く、自身の研究を発展させるには至りませんでした。本奨励金のおかげで研究活動を行うことが出来ました。皆様のご支援によって、研究者が安心して研究を遂行できる環境が整い、ひいては日本の科学の発展につながっております。

改めまして、このようなご支援を頂きましたこと大変感謝しております。今後はこれを励みに、社会に還元できるような研究を継続して行っていきたくと思っております。