

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 高橋 育子

学位論文題名

Identification of plasma microRNA as a novel biomarker of sporadic amyotrophic lateral sclerosis

(血漿 microRNA を用いた新規筋萎縮性側索硬化症バイオマーカーの検討)

[背景と目的] 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) は、主に中年期以降に発症し、全身の骨格筋の筋力低下と筋萎縮が進行する神経変性疾患である。ALS に関し、臨床的な発症前を含む早期診断、発症後の予後の予測、疾患原因の解明、及び将来的に行われる臨床治験等の際に用いられる治療効果判定への活用のため、バイオマーカーが早急に必要とされている。これまで考慮されたバイオマーカーは、神経学的指標の他、血液、髄液などの体液や、脳機能画像などが検討されてきたが、病態を十分反映し、臨床的に運用可能なバイオマーカーは未発見である。ALS はその殆どが孤発性の疾患であるが、5-10%程度に家族性 ALS が散見される。既報の家族性 ALS の原因遺伝子には、RNA 認識ドメインを持ち、RNA のプロセッシングに関与するタンパク質をコードした遺伝子が複数確認されている。その一つである TDP-43 の mRNA は自身の発現量を自己調節するという報告があり、核及び細胞質内における TDP-43 の恒常性に起こる異常が ALS の原因の一つと考えられている。更に、欧米も含めた場合最も多い家族性 ALS の原因遺伝子である C9orf72 は非コード性であるが、その病態仮説の一つに繰り返し配列部位の転写後 RNA の異常蓄積による細胞毒性が考えられている。以上の如く、ALS の病態には RNA 代謝の異常が背景にある事が指摘されているが、我々は遺伝子を抑制し働く、非コード性かつ機能性の小分子(18-25 塩基)性 RNA であり、神経組織の維持、成長にも不可欠である事が指摘されている microRNA(以下 miRNA)に注目した。

[対象と方法] ALS 患者 16 人、及び同時期にボランティアとして血液を提供した特に疾患背景の無い健常対照群 10 人を Discovery cohort として後述するマイクロアレイ解析の対象とした。また、ALS 患者 48 人及び年齢性別に有意差が現れないよう調整した健常対照群 47 人、また疾患対照群としてパーキンソン病患者 30 人を Validation cohort として逆転写リアルタイム PCR 法による検討の対象とした。全ての ALS 患者に対し採血と同時に以下の情報及び臨床的スケールを評価した。全ての患者は事前に DNA より最も孤発性 ALS に良く認められる遺伝子異常である C9ORF72 異常伸長リピートの有無を事前に確認し異常を認めないことを確認した。

マイクロアレイ解析、リアルタイム PCR のいずれも disodium ethylenediaminetetraacetate (Na₂EDTA) 採血管にて採血後、速やかに 3000 回転 30 分間 4 °C で遠心分離を行い-80 °C に凍結保存した凍結血漿を使用した。マイクロアレイ解析では約 1800 の蛍光プローブを基盤に搭載した 3D-Gene® Human miRNA oligo chip (Ver.

17.0) (TORAY Industries, Inc., Tokyo, Japan) を用い網羅的に解析を施行, 数値化した後に paired t test, Wilcoxon rank sum test, fold change ratio を用いて比較検討した. リアルタイム PCR は total RNA 抽出後 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) を用い濃度の測定及び品質の確認を行った後, 逆転写を施行, 得られた cDNA, miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) 及び miScript Primer Assays (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を用いて施行した. 解析においてはマイクロアレイ解析において最も小さな分散及び患者健常者間で差が見られず十分高い検出量であった hsa-miR-4516 を内在性コントロールとして比較定量のため使用し, Student's t test, Receiver Operating Curve (ROC), Pearson の相関係数について検定を行った.

[結果] Discovery cohort を用いた網羅的なマイクロアレイ解析の結果, 3種の増加した miRNA 及び6種の特に減少した miRNA を認め, バイオマーカー候補とした. この増加, 減少した miRNA に対して年齢及び性別に有意差の出ない Validation cohort である48例の ALS 群及び77例の対照群に対してリアルタイム PCR 解析を行った. マイクロアレイ解析と共通し, ALS では hsa-miR-4649-5p の増加, hsa-miR-4299 の減少をリアルタイム PCR でも認め, これらは有力なバイオマーカー候補であると考えた. これらの miRNA は, 年齢, 性別を初めとして, 臨床症状及び病期などとの明らかな関連は持たなかった.

Validation cohort を施行した検体についてはゲル電気泳動をもとにした Bioanalyzer2100® を用い抽出 RNA の濃度測定を施行した. 10-40ntRNA の割合は ALS 患者で有意に増加した他, 抽出した RNA 全体の濃度は病期と負の相関を示した. リアルタイム PCR の結果がマイクロアレイの結果を再現しなかったものに関しては, hsa-let-7f-5p は四肢の症状から初発した spinal-onset の患者でより減少する傾向を認めた. また, hsa-miR-663b は同一患者を複数回採血した場合, 病期後半で増加傾向を認めた.

[考察] 我々は ALS の疾患バイオマーカーとなる可能性のある, 細胞そのものの内容を含まない循環環境中に現れる miRNA を2つの異なる方法で評価した. マイクロアレイ解析を用いた discovery cohort において, 有意に増加, 減少した miRNA を抽出し, それらをマイクロアレイとは異なるリアルタイム PCR を用いた validation cohort において再度検討した. 共通した挙動を示した hsa-miR-4649-5p 及び hsa-miR-4299 のターゲット遺伝子群はそれぞれ神経系との濃密な関連を疑わせるものが多かった. また, hsa-miR-4299 は我々の血漿からの報告においては減少が認められたが, 既報において ALS 患者の FFPE (formalin-fixed paraffin embedded) 標本の運動領域で増加が報告されており, 細胞内か, 分泌された細胞外に存在するものが大きく影響していると考えられる. hsa-miR-4649-5p 及び hsa-miR-4299 にはまた, 共通したターゲット遺伝子として EPHA4 が認められる. EPHA4 は ALS の動物モデル及びヒトの双方で高く発現し, 変異 TARDBP 及び変異 SMN 発現神経細胞において EPHA4 のノックダウンを加える事で軸索変性を改善する事が報告されている disease modifier としての機能が報告されている. hsa-miR-4649-5p と hsa-miR-4299 の増加は EPHA4 を抑制する事につながるため, 神経死への対抗的な機能となり得ると考えられる.

[結論] ALS 患者血漿においてマイクロアレイ解析及びリアルタイム PCR により共通した挙動を示す miRNA を探索し, ALS では hsa-miR-4649-5p の増加, hsa-miR-4299 の減少を認めた. これらは有力なバイオマーカー候補であり, また将来的な核酸医薬の可能性として, 疾患進行の抑制にも有用である可能性が考えられた.