



Title	Identification of plasma microRNA as a novel biomarker of sporadic amyotrophic lateral sclerosis
Author(s)	高橋, 育子
Description	配架番号 : 2216
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12112号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12112
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61642
Type	doctoral thesis
File Information	Ikuko_Takahashi.pdf



学位論文

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)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

高 橋 育 子

学位論文

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)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

高 橋 育 子

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	8 頁
方法	9 頁
結果	15 頁
1. 患者群及び対照群の臨床的特徴	15 頁
2. repeat primed PCR 法による C9orf72 繰り返し配列異常伸長の除外	17 頁
3. Bioanalyzer 2100®を用いた血漿中 RNA の評価	18 頁
4. マイクロアレイを用いた網羅的解析によるバイオマーカー候補及び内在性コントロール候補となる microRNA の抽出	20 頁
5. リアルタイム PCR 法を用いたバイオマーカー候補 microRNA の測定	22 頁
6. microRNA のターゲット遺伝子の予測及び生物学的プロセスの分析	26 頁
考察	33 頁
総括および結論	38 頁
謝辞	39 頁
引用文献	40 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した.

Ikuko Takahashi, Yuka Hama, Masaaki Matsushima, Makoto Hirotsu, Takahiro Kano, Hideki Hohzen, Ichiro Yabe, Jun Utsumi, Hidenao Sasaki

Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis
Molecular Brain, 8 • 67,(2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

Ikuko Takahashi, Ichiro Yabe, Jun Utsumi, Hidenao Sasaki

Identification of plasma miRNA as sALS biomarker

第 56 回日本神経学会学術大会, 2015 年 5 月 21 日 ポスターセッション (新潟市朱鷺メッセ)

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は成人期, 特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。発病率は 10 万人当たり 2 人前後とされているが, 近年の報告ではそれを上回るものが多く, 日本全体での有病率については 10 万人あたり 7.0-8.5 人となっている¹。ほとんどが孤発例であるが, 約 5.1%の家族性の発症が認められる²。

臨床症状としては痙縮や深部腱反射の亢進, Babinski 反射などに代表されるような異常反射の出現などの上位運動ニューロン症状と, 筋萎縮, 筋力低下などに代表される下位運動ニューロン症状が共に出現し, 神経学的所見上の特徴といえる。一方で古典的に陰性症状が指摘されており感覚障害及び自律神経障害 (発汗障害, 膀胱直腸障害) についてはほぼ認めることはなく, 眼球運動障害も他の随意運動が早くに不可能となるのに比べ晩期にならなければ出現しない。発症から平均 2-3 年で四肢, 顔面, 舌の筋萎縮及び筋力低下が著明となり, 嚥下障害が進行し喀痰の排出ができなくなり, 更に呼吸筋麻痺が起こるため, この時期に永続的な人工呼吸器の使用がない場合は死亡する。

ALS は臨床神経学の父と現在称されている Jean-Martin Charcot (1825-1893) により, 1874 年に臨床及び病理学的検討を合わせ, その病態の首座が脊髓前角及び側索に局在すると推定され, ほかの疾患と分離され名前と与えられた³。その病名は, アメリカ合衆国のメジャーリーグの強豪であるニューヨークヤンキースにおいて「蒸気機関車」の名前を持つ連続出場世界記録を持つ強打者であった Lou Gehrig (1903-1941) が罹患し引退を余儀なくされ広く世間に周知されるようになった⁴。近年においてはアメリカ ALS 協会に対するチャリティーとして著名人が多数参加した ice Bucket Challenge は非常に早いスピードでソーシャルメディアを通じて拡散し多額の寄付金が寄せられたことも記憶に新しい⁵。

ALS の臨床所見については従来, 高次機能障害は伴わないとされていたが, 近年は認知機能障害が, 病状の進行と共におよそ 20-50%の患者に出現することが報告されており, 更に認知機能障害が出現する患者はそうでない患者に比べて進行が早いことが報告されている⁶。認知症の特徴は行動異常, 性格変化や意欲の低下, 言語機能の低下として現れ, 記憶, 見当識の障害は目立たず, 認知機能障害のパターンは前頭葉型認知症 (Frontotemporal dementia; FTD) に類似する。逆に, FTD において上位, 下位運動ニューロン症状を認めることもまた稀ではなく, 後述する神経病理所見において ALS の運動ニューロンと同様のパターンのニューロンの変性所見を認める報告や, 家族性 ALS の原因遺伝子において両方の症候を同一家系に認める報告が多数ある。FTD の病理所見には, Pick 病に代表されるタウ蛋白陽性封入体が認められ病因と考えられ

る群もあるが、後述する神経細胞内にリン酸化 TDP-43 陽性封入体を伴う変性を認めるタイプの FTD と ALS は臨床、病理、遺伝学的研究上において一つの疾患群として検討する必要性が論じられている⁷。

ALS の診断基準については、上位運動ニューロン徴候及び下位運動ニューロン徴候が複数の領域に共に出現していることが必要とされ、過去に何度かの改定があったが、概ね現在は El Escorial and Airlie House diagnostic criteria が用いられている⁸。診断基準における神経学的所見の他に重要とされる所見として、自覚、他覚的に感知できない場合であっても、針筋電図所見によって急性及び慢性の脱神経所見を併存して認めた場合は下位運動ニューロン症状として認定でき、診断可能な場合がある。そのほかの画像診断などは 2015 年現在の臨床においては主に脳血管障害や頸椎疾患などとの除外診断のために行われているが、時として脳単純 MRI 検査の T2 weighted image や proton weighted image では錐体路に異常信号を認める他、diffusion tensor imaging や Positron emission tomography を始めとする新しい脳機能画像を用いた診断が期待されている⁹。臨床的な診断基準を用いて ALS の診断を行う場合、症状が複数の領域に出揃うことが必要であるため、どうしても診断確定後には進行している状況となる。しかし、現時点で維持及び改善可能な治療薬が存在せず、かつ致死的な疾患であるため過剰診断は避けなければならない、症状が出現し始めた時期の診断は難しい。また、ALS の診断において筋力低下の範囲が限られた領域にとどまっている発症まもない時期に、診察上筋力低下のない四肢の針筋電図を施行した場合に脱神経所見が認められることは臨床において非常に良く経験することであり、この点からも初発症状出現前に運動ニューロンの脱落は始まっていると考えられるが現在前駆期をとらえる有効な方法も存在しない。この点を満足できる早期診断可能な方法の開発が必要とされている。

ALS においては病理学的にも脊髓前角細胞の著明な脱落と錐体路変性を特徴とする。大脳の一次運動野の皮質、延髄舌下神経を含む脳幹部運動神経諸核、脊髓前角に存在する運動ニューロンは萎縮、脱落するのみならず、細胞内部に特徴的な構造物を認める。Bunina 小体は好酸性、抗シスタチン抗体に陽性の特徴を持ち ALS に特異的であるが、全ての ALS に観察されるわけではない。Skein-like inclusion は抗ユビキチン抗体に陽性である細胞質内封入体であり、これも ALS に特異的である。一方で、脊髓前角細胞にある神経細胞でありながら、第二仙髄前角腹側部の Onufrowicz 核 (Onuf 核) はよく保たれており、膀胱直腸障害が認められにくい臨床所見上の特徴と呼応していると捉えられている¹⁰。2000 年代後半には孤発性 ALS に共通してリン酸化 TDP-43 陽性所見が上記の封入体中に発見された。この病理像が先に述べた FTD の一部、特に ALS に FTD が合併する症例に共通して認められ、さらには臨床的に FTD 単独であっても同様の病理所見を認めた症例が複数報告され、さらに TARDBP 遺伝子の変異を伴う家族性 ALS の家系中에서도臨床的に FTD を呈した患者を認めたことで、これらは

TDP-43 proteinopathy として同一スペクトラムの疾病と考えられるようになった¹¹.

ALS の病因については先に述べた、全体の 5%前後と言われている家族性 ALS の遺伝子解析及び、その遺伝子変異箇所に着目した実験動物をベースとした基礎研究に伴う研究によって研究されている。1990 年代初めに連鎖解析を用いて特定された SOD1 遺伝子変異は 2000 年代半ばになるまで長く家族性 ALS を説明する唯一と言って良い遺伝子であった。現在は家族性 ALS 全体のおおよそ 12%前後を占めている。その多くは missense 変異であり、変異箇所の幾つかは症例数が多く、また変異マウスなどの実験動物も多数の種類が作製された。しかし、これらの病理は TDP-43 病理像を欠いており、また先に述べた認知機能障害を伴う割合が低いなど、他の孤発性 ALS の病態からは独立している可能性も指摘されている¹².

TARDBP 遺伝子は先述したコードしているタンパク質である TDP-43 の孤発性 ALS の病理学的異常所見の発見とほぼ時を同じくして家族性 ALS における原因遺伝子として特定され ALS 研究の歴史においては最も印象に残る病態研究の成果となった。この直後に FUS もまた原因遺伝子として特定され、ともに RNA-binding domain などの共通する構造をもつ RNA 代謝に深く関わることが注目された。

C9orf72 は 9 番染色体短腕に存在する非コード領域にある DNA 配列である。GGGGCC の繰り返し配列の挿入が極端に延長する変異が指摘され、結果的に欧米においては現在 ALS 及び FTD において最も頻度の高い原因遺伝子であり、家族性 ALS の 40%、家族性 FTD の 25%を占め、さらに孤発性 ALS でも 7%に認められると報告されている^{12,13}。しかしこの変異については日本をはじめアジアでは極めて稀と報告されており、日本人の ALS 症例の多くには当てはまらず、また病理像においてもリン酸化 TDP-43 陽性の病理像は認めない。C9orf72 の繰り返し配列延長が運動ニューロンの変性をもたらす機序としては転写された RNA が分解されず核内に凝集して蓄積し毒性を発現する可能性、また開始コドンを経さないリピート関連翻訳が観察されるため、形成されたペプチドによる影響などが仮説として指摘されている。他に、日本人の血縁結婚の家族性 ALS 家系を解析して発見された OPTN があるが、この遺伝子はもともと家族性正常眼圧緑内障の原因として指摘された遺伝子であり、様々な生命現象への関与が報告されている転写因子 nuclear factor-kappa B を生理的には抑制するが、家系において認められた変異によってその抑制効果の消失が認められた。OPTN 変異型の ALS の病理では孤発性 ALS と共通してリン酸化 TDP-43 陽性封入体が確認されるなど、他の孤発性 ALS に共通する病態を説明する可能性があるものとして注目されている¹⁴。

ALS の治療は現在まで長く課題となっている。国内において保険収載された薬物としてはリルゾール、2015 年 6 月に承認されたエダラボンがあり、また 2015 年 4 月には American Academy of Neurology Meeting 2015 でメチルコバラミン大量療法による進行

抑制が報告された。しかしいずれも限られた病期と診断カテゴリーに患者を分類した上で優位性を認められた薬剤であり、かつその効果もまた永続的ではなく、進行を数ヶ月程度抑制するものである¹⁵。また、侵襲的陽圧換気療法を施行し当座の呼吸困難を回避できたとしても、現行法に則ると施行を中止して即座に死亡が予測される場合は換気療法中止は全く不可能となる。随意的に運動可能な部位が減ることには変わりなく、ついには完全閉じ込め状態となり意識はあると考えられるが周囲への意志伝達が完全に不可能となるため、侵襲的陽圧換気療法を行うかどうかの決断は非常に患者、家族及び医療者の双方にとって難しいものとなる。また、先にのべた通り診断がなった時にはすでに考慮するために使用できる時間は短く、また患者によっては認知機能障害が出現しており病識が欠如し、判断力が失われている場合があり自己決定そのものが難しい。多くの ALS 患者と家族は診断を受けた後に、積極的な症状の改善を期待できる治療の不在を知らされた上で、数ヶ月後に迫っている嚥下障害や呼吸障害に備え、胃瘻造設や気管切開術、そして中途での中止を許さないという条件の上で侵襲的陽圧換気療法を行うか否かの決定を急がされているのが現在の臨床における実情である。

ALS の予後予測についてはその臨床経過に関連したものはこれまで複数の報告がある。発症早期に複数領域に進展する例、及び発症から診断確定までの時間が短時間である例では予後不良であり、また ALSFRS-R の期間毎の変化も指標となる^{1,16,17}。しかし、これらの予後に関する指標もまた、そのイベント発生すなわち死亡ないしは侵襲的陽圧換気療法開始の時期までにはごく短いために一部を除けば将来的な治験に際しての効果の指標とするには難しいものが多い。

以上の特徴を持つ 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。これまで ALS の疾患原因として考えられ研究が進められてきた病態仮説である機序、すなわち神経細胞の興奮毒性、酸化ストレス、神経炎症、栄養及び代謝障害、神経変性などに関連する 60 種類以上のバイオマーカー候補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¹⁸。

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 (FUS, TARDBP, SETX, MATR3, TAF15, HNRNPA1, HNRNPA2B1, GLE1 など)¹⁹。その内の一つとして、ALS においては、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²⁰。また先述した通り C9orf72 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の仮説も検討されている²¹。

以上の如く, ALS の病態には RNA 代謝の異常が背景に示唆されているが, RNA の多くは細胞外においては検出が不安定になってしまうため, 組織の採取が病態の首座と考える中枢神経である神経変性疾患の解析に関し, 生前に検討することは難しいと言える。そこで我々は細胞内における RNA プロセッシングに関与し, かつ細胞外にも分泌され安定して存在する microRNA (以下 miRNA) が, 病態を反映できるバイオマーカー候補となり得ないか注目した。

miRNA は mRNA をターゲットとし遺伝子を抑制し働く, 非コードかつ機能性の小分子(18-25 塩基)RNA である²²。非コード RNA は, タンパク質の情報が書き込まれていない RNA であり, 植物, 動物の双方の遺伝子のはたらきを広く制御する。複雑な生物種ほど非コード RNA の種類を多数持つことが指摘されており, 原核生物では DNA から転写される RNA の中の 25%を占める程度であるが, 真核生物では 50%を超え, さらにヒトでは 98.5%に及ぶ²³。非コード RNA の種類と具体的な機能例をいくつか挙げるとすれば, 翻訳におけるアダプター分子である転移 RNA, 他の RNA や低分子を触媒する酵素として機能するリボザイム, 核内で構造体を形成する long non coding RNA, ならびに遺伝子の発現を抑制する小分子 RNA である miRNA 及び small interfering RNA (siRNA) がある。線虫の胚発生のための細胞分裂が野生型と異なるヘテロクニック変異体の研究において 21 塩基からなる小分子 RNA(let-7, lin-4)を認め, これらはタンパク質を構成せずに胚発生を制御していると報告されたことが miRNA の発見の経緯である²⁴。miRNA はその後次世代シーケンサーの出現もあり, 現在までヒトにおいては配列候補はのべ 2000 種類以上がデータベース上に登録されている。それぞれの miRNA は 200 以上の遺伝子を標的とし, 各々の mRNA は複数の miRNA により発現調整を受けており, またタンパク質をコードする遺伝子の約半数は miRNA により制御を受けている (miRBase, www.mirbase.org)²⁵。miRNA は転写を受けた後, 5 末端及び 3 末端にそれぞれ修飾を受け, ループ状の pri-miRNA となった後, Drosha, Pasha により末端を切断され pre-miRNA となる²⁶。pre-miRNA は Exportin 5 に結合し, 核内から細胞質に移行する。更にその後ループ部分を Dicer により切断された後二本鎖の状態 Argonaute タンパク質に取り込まれ, 相補鎖が引き剥がされたのちに一本鎖の成熟 miRNA となる。最終的には 7-8 塩基程度の seed 配列を露出させ, その他の多くの部分を Argonaute タンパク質により覆われる。miRNA を取り込んだ Argonaute タンパク質は, 他の複数の分子と RNA induced silencing complex (RISC)を形成し, 露出している miRNA の seed 配列部分が標的遺伝子に結合, 直接機械的にリボソームの働きを止めて翻訳開始の阻害を行うか, mRNA の 3'末端に存在するポリアデニル構造に対し, 脱アデニル化を促して mRNA を不安定化する。他に RISC を形成せず Argonaute タンパク質のみに覆われている状態でも miRNA 全体が相補的に mRNA と結合する場合など

は直接 mRNA を切断すると報告されている。miRNA による mRNA のサイレンシングの仕組みはもともと不完全な相補鎖であっても機能可能な点から、その標的遺伝子との間の相補的な配列の割合や伴うタンパク質などの種類によって変化し、周囲の文脈に応じて多様な働きを見せるという点が、一様にターゲットとなる RNA を分解し抑制する siRNA とは異なる点である²⁷⁻²⁹。miRNA は更に細胞外に分泌されるが、上記の Argonaute タンパク質と結合した状態以外に、HDL コレステロール、エキソソームに取り込まれた状態で RNA 分解酵素にも分解されず、血漿循環環境中に安定して存在できる³⁰。上記のような性質を持つことより、細胞や臓器を超え、多数の遺伝子の発現調整に関与すると予測されていたが、実際に悪性腫瘍では転移や浸潤に先立ち、一定の種の miRNA に発現量が変化する報告に加え、腫瘍を抑制、あるいは亢進する働きが解析されており、ヒトにおいても分泌、取り込みが意味をもって機能すると証明され、さらに治療への応用も可能性を検討しうると考えられる³¹。

miRNA は神経組織の維持、成長にも不可欠であると指摘されている。実験動物においては miRNA の成熟において必須の酵素である Dicer を抑制したところ脊髄性筋萎縮症様の脊髄の変性が惹起されると報告された³²。また先述した ALS の TDP-43 タンパク質はまた、Drosha, Dicer と結合し得ると報告されている³³。これまでの他の神経変性疾患についてはアルツハイマー病、パーキンソン病において比較的大きな規模での miRNA の検討が行われている³⁴。また、アルツハイマー病のモデル動物で miR-206 の増加と、その機能抑制による病理像の改善などの機能的な側面の解析も報告されており、神経変性疾患の病態像においても miRNA は重要と考えられる³⁵。

上記を踏まえ、我々は病態と密接な接点を持ち得るバイオマーカー候補として患者血漿における miRNA を検討した。検討にあたり、再現性をもって miRNA の増加、減少をとらえるため、少数の患者、対照群を対象とした網羅的なマイクロアレイ解析を施行し、その中で特に増加、減少を示した miRNA に対して患者、対照群を大幅に増やしたりリアルタイム PCR 法を施行した。結果として共通して増加、減少を示した miRNA を各々1種類認め、他に臨床症状と強い関係性を認める miRNA 候補を見出した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ALSFRS-R	ALS Functional Rating Scale revised
FDR	false discovery rate
FFPE	formalin-fixed paraffin embedded
FTD	Frontotemporal dementia
GO	Gene ontology
hnRNP	heterogenous nuclear RNA
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
Na2EDTA	disodium ethylenediaminetetraacetate
RISC	RNA induced silencing complex
ROC curve	Receiver Operating Characteristic curve
siRNA	small interfering RNA

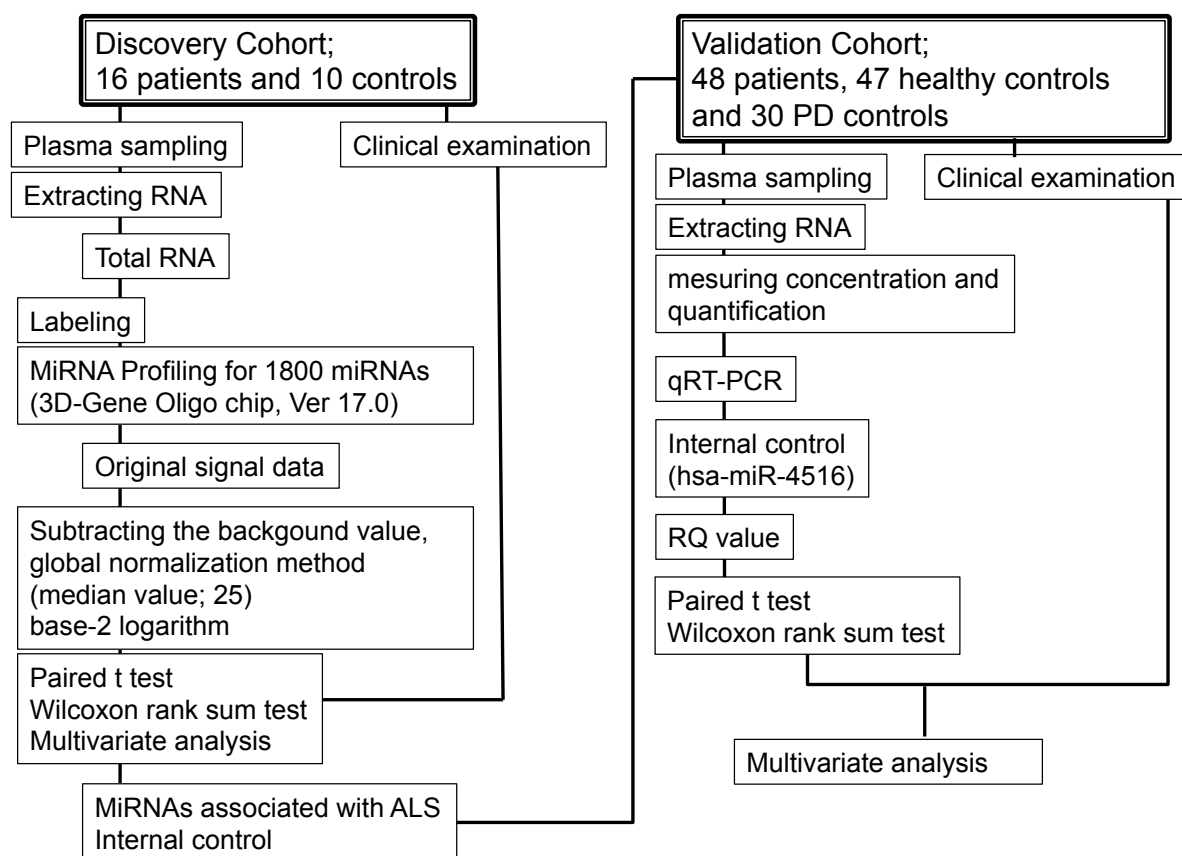
方法

1. 患者群及び対照群の選定

2008 年 8 月より 2012 年 9 月までに北海道大学病院神経内科を受診した家族内発症者を伴わない 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ない健常対照群 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、2009 年 10 月より 2014 年 9 月までに北海道大学病院神経内科及び帯広厚生病院神経内科を受診した 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象群 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 患者は日本神経学会の定める神経内科専門医資格を持つ医師により、神経学的検査及び電気生理学的診断を受けた。診断基準は現在国内外で最も治験及び臨床研究に使用されている El Escorial and Airlie House diagnostic criteria を用い、clinically possible 以上であるものを対象とした⁸。除外基準としては、上位ないしは下位運動ニューロン徴候のみを呈した場合及び、他の神経疾患の徴候を呈したものについては除外とした。全ての患者及び対照群は腫瘍などの重篤な疾患や hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, human T-cell leukemia virus type 1 への罹患をしていないことを確認した。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；採血時の年齢、発症から採血までの間隔、発症から死亡ないしは侵襲的陽圧換気療法開始までの病期、初発症状、ALS Functional Rating Scale revised (以下 ALSFRS-R)¹⁷、ALSFRS-R における球麻痺スコア、Barthel Index³⁶。帯広厚生病院神経内科においてはまた、Validation cohort に参加した ALS 患者の 7 人が半年ないしは 1 年の間隔を明け 2 回以上の採血を施行した。上記の計画について、我々は双方の病院及び北海道大学の倫理委員会に対して自主臨床研究の承認を得た。(平成 25 年 9 月 2 日通知、北海道大学病院、臨床研究番号 自 009-0316, 「神経疾患の診断及び進行度評価に役立つバイオマーカーの探索に関する研究」平成 26 年 4 月 10 日通知、北海道大学病院、臨床研究番号 自 010-0199, 「比較対照群としての神経疾患非保有者血漿、血清、尿試料バンク」平成 26 年 7 月 31 日通知、北海道大学大学院医学研究科、医 14-039, 「筋萎縮性側索硬化症および多系統萎縮症のマイクロ RNA 解析」平成 26 年 8 月 19 日通知、北海道大学大学院医学研究科、医 13-035, 「難治性疾患発病素因解析のための比較対照群血液・ゲノムバンク構築に関する研究」平成 27 年 6 月 5 日通知、北海道大学大学院医学研究科、医 14-021, 「筋萎縮性側索硬化症の発症素因および病態解明に関する研究」。帯広厚生病院 平成 24 年 7 月 5 日通知, 「神経疾患の診断及び進行度評価に役立つバイオマーカーの探索に関する研究」.)

我々は患者及び対照群の参加者に対しては口頭と書面の双方で説明を行い、同意を得た。実験の流れの概要は Figure 1 に記す。

Figure 1 A scheme of two cohorts and analysis.



2. C9orf72 異常伸長リピートの確認

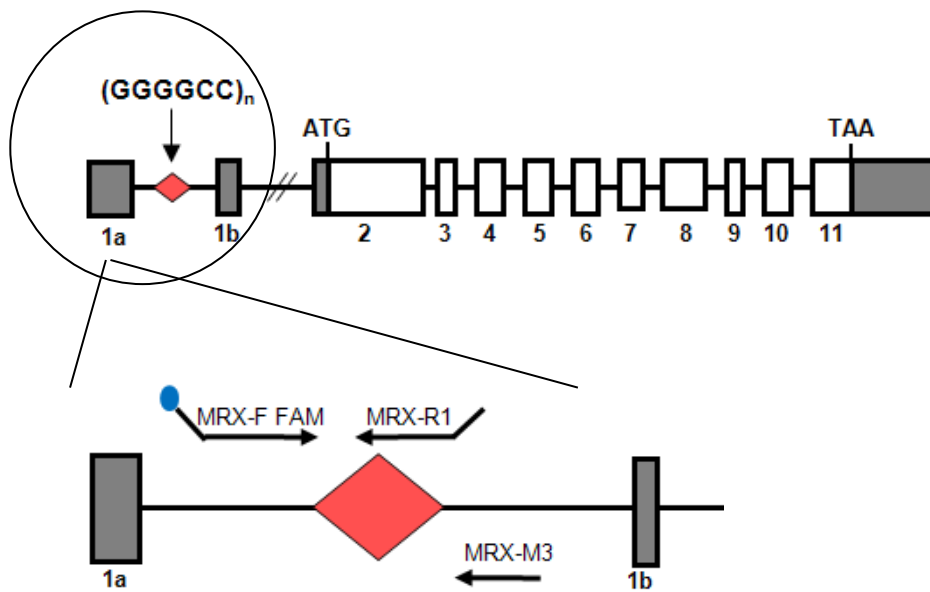
患者 DNA サンプルは繰り返し配列部分に対する PCR 施行後にフラグメント解析を行う"ジェノタイピング PCR" により、繰り返し配列部分がヘテロ接合性であるか、ホモ接合性であるかを確認した。ホモ接合性を示したサンプルについては、実際にホモ接合性である場合と、そうではなく繰り返し配列が異常伸長している場合が考えられることから、これらについて repeat primed PCR を施行した。これらの実験は既報を参考に施行した¹³ (Figure 2).

i) ジェノタイピングPCR繰り返し配列部分の増幅に関し、以下のプライマーを作製した (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). フォワードプライマーのみ蛍光ラベル付きとした; 5'-CAAGGAGGGGAAACAACCGCAGCC-3'(フォワードプライマー), 5'-GCAGGCCACCGCAACCGCAG-3'(リバースプライマー): サンプル DNA の濃度は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA) を用い 50 ng/μl に調整した。PCR ミックスとして、水 8.9 μl, 10x buffer 2 μl, dNTP's mix 1 μl, フォワードプライマー, リバースプライマー(10 μM) 各々 1 μl, Taq DNA polymerase 5000 u 0.1 μl, DMSO (Sigma-Aldrich) 1 μl, Betain (Sigma-Aldrich) 4 μl, DNA (50 ng/μl) 1 μl. サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP 650 (タカラバイオ株式会社, 日本) を使用。94°C 4 分間の熱変性の後 94°C 30 秒, 62°C 40 秒, 72°C 1 分を 36 サイクル行い, 72°C 10 分にて終了。フラグメント解析は ABI3100 Genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行った。また、アレル解析は Gene Mapper v4.0 software (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。

ii) 3 リピートプライマーPCR

以下のプライマーを作製した (Sigma-Aldrich). フォワードプライマーに対しては蛍光ラベルを用いた。5'- tgtaaaacgacggccagtCAAGGAGGGGAAACAACCGCAGCC-3' (MRX-F_FAM, フォワードプライマー), 5'-caggaaacagctatgaccGGGCCCCGCCCCGACCACGCCCCGGCCCCGGCCCCGG-3' (MRX-R1, リバースプライマー), 5'- caggaaacagctatgacc -3'(MRX-M13, M13R リンカー).

Figure 2 Genomic structure of the *C9orf72* and schematic representation for the 3 primer PCR.



サンプル DNA の濃度は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い 100 ng/μl に調整した。PCR ミックスとして、水 8.9 μl, 10 x buffer 2 μl, dNTP's mix 1 μl, フォワードプライマー, リバープライマー(10 μM) 各々 1 μl, Taq DNA polymerase 5000 u 0.1 μl, DMSO (Sigma-Aldrich) 1 μl, Betain (Sigma-Aldrich) 4 μl, DNA(100 ng/μl) 1 μl. サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP650 (TaKaRa)を使用。98°C 10 分間の熱変性の後 97°C 35 秒, 64°C 2 分, 68°C 8 分を 10 サイクル行い, その後 97°C 35 秒, 64°C 2 分, 68°C 8 分 20 秒を 25 サイクル施行し終了。PCR 反応終了後にプロダクトのうち 1 μl を 5 μl の水に溶解。その 2 μl を HiDi Formamide (Thermo Fisher Scientific Inc.) 及び GeneScan 400 HD Rox size standard (Thermo Fisher Scientific Inc.) と混和後, 95°C 2 分間加熱し熱変性を行った。解析は ABI3100 Genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行った。また, アレル解析は Gene Mapper v4.0 software (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。

3. Discovery cohort に対する RNA 抽出及びマイクロアレイ解析

血液は 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, 血漿成分を -80°C に凍結保存した。凍結血漿 300 μl より 3D-Gene® RNA extraction reagent (TORAY Industries, Inc., Tokyo, Japan) を用い RNA を抽出後, その半量を使用した。Exiqon miRCURY LNATM microRNA Array Power Labeling kit (Exiqon Inc., Woburn, MA, USA) を用いて標識化した後, 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.) を用いて解析を行った。析出されたシグナルデータより, 背景ノイズ分を引き, 中央値を 25 としたグローバルノーマライゼーション法を用い数値化した。

miRNA 種から算出された数値は paired t test, Wilcoxon rank sum test, fold change ratio, variance について JMP® Pro 11.0.0. (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)を用いて比較検討した。

4. Validation cohort に対するリアルタイム PCR

凍結血漿 200 μl より miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を用い RNA を抽出した。400 amol に相当する C.elegans miR-39-3p (Cel-miR-39-3p) 合成オリゴヌクレオチド RNA (Sigma-Aldrich) を spike-in コントロールとして, 脂質, タンパク質の変性を目的とした溶液の添加後の時期に混入した。

抽出後の RNA は測定装置である Bioanalyzer2100® (Agilent Technology Inc., Urdorf,

Switzerland) を用いチップ及びゲル電気泳動の溶液である Agilent RNA 6000 pico kit 及び Agilent small RNA kit (Agilent Technology Inc.) を用いて濃度の測定及び品質の確認を行った。その結果より 1 ng に相当する RNA を含むように miScript II RT kit (QIAGEN Inc.) を用い逆転写反応を cDNA 産物が 20 μ l となるよう行った。

得られた cDNA, miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN Inc.) 及び miScript Primer Assays (QIAGEN Inc.) からリアルタイム PCR 用のマスターミックスを作製し, Applied Biosystems® StepOnePlus™ real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて個々の miRNA を定量した。11 種の Qiagen miScript primers (QIAGEN Inc.) を使用した: hsa-miR-4258, hsa-miR-663b, hsa-miR-4649-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-4299, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-4419a, hsa-miR-3187-5p, hsa-miR-4496, cel-miR-39-3p and hsa-miR-4516. hsa-miR-4516 に関し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ことから、内在性コントロールとして使用した。それぞれの miRNA は比較定量した値を使用し, Student's *t* test, Receiver Operating Curve (ROC), Pearson の相関係数を JMP® Pro 11.0.0. を用いて検定した。p 値はいずれも <0.05 を統計学的有意とした。

結果

1. 患者群及び対照群の臨床的特徴

Discovery cohort として 16 名の ALS 患者及び 10 名の健常対照群, Validation cohort として 48 名の ALS 患者と 77 名の対照群 (47 名の健常対照と 30 名の疾患対照が内訳であり, 疾患はパーキンソン病である) を設けた. 以下の Table 1 にその詳細を記す. 患者及び対照は, それぞれの cohort 毎に重複はない. Discovery cohort において, 性別及び年齢に関し ALS と対照群の間で差があるが, Validation cohort においてはいずれも有意差のない様, あらかじめ配慮した. Validation cohort に参加した 7 名の患者は初回の採血後, 6 ヶ月ないし 12 ヶ月の間隔を空け 2 回以上の採血を行えた. なお, 二度目以後の採血に関しては Validation cohort に含まないので影響しない.

Table 1. General and clinical characteristics of the study subjects respective of cohort.

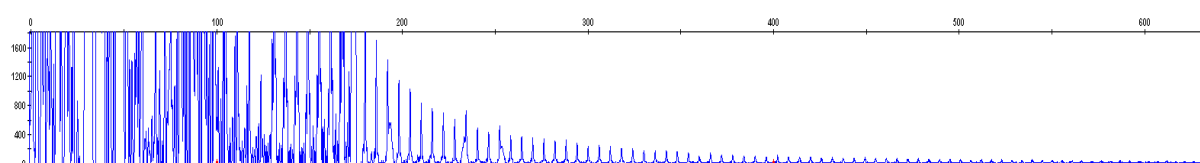
Type of cohort	Discovery cohort (N=26)		Validation cohort (N=125)		
	sALS patients (n=16)	healthy controls (n=10)	sALS patients (n=48)	healthy controls (n=47)	disease controls (n=30)
Age (mean±SD)	65.62±9.11	49.30±14.88	66.67±10.52	67.08±10.89	69.00±5.91
Gender (n)	9	5	29	29	17
Male					
Females	7	5	19	18	13
Disease duration from onset to collection, months (mean±SD)	17.18±9.29		20.04±18.43		
Bulbar	3		20		
Upper limb	10		17		
Lower limb	3		11		
ALSFRS-R (mean±SD)	36.06±10.59		33.15±11.72		
Bulbar paralysis scores of					
ALSFRS-R (mean±SD)	9.75 ±3.51		8.06±4.04		
Barthel Index (mean±SD)	72.19±31.99		68.02±34.23		
Disease duration from onset to end point, months (mean±SD)	31.00±13.66		28.58±18.72		

2. repeat primed PCR 法による C9orf72 繰り返し配列異常伸長の除外

今回検討した 64 名全ての ALS 患者において C9orf72 異常伸長リピートは認められなかった。

genotyping PCR において hetero 接合性であった患者は 36 名, homo 接合性であった患者は 28 名であった。homo 接合性であった患者名について repeat primed PCR を施行したが、いずれも陽性コントロール症例（外部施設より頂いた検体）で認めた stutter pattern (Figure 3) は示さなかった。

Figure 3. C9orf72 positive controls showed Stutter pattern.



3. Bioanalyzer 2100®を用いた血漿中 RNA の評価

Bioanalyzer 2100®による抽出後の RNA 濃度及び品質の測定を行った。測定を期待する RNA の大きさに応じて Agilent RNA 6000 pico kit, 及び Agilent Small RNA kit を用いた。前者は total RNA 全体の測定を行い、後者は主に 150 nt 未満の短鎖の RNA の測定に用いる。total RNA の収量については、ALS 患者では健常対照群に比べて有意に分散が大きい傾向を認め(両側 F 検定 $F = 2.87$, $p = 0.0005^*$)(Figure 4), さらに臨床的評価スケールとの多変量解析を行うと、発症から end point である死亡ないしは永続的な侵襲的陽圧換気の開始までの期間との間に逆相関関係を認めた(Figure 5)。また、10-40 nt の miRNA を含む短鎖の RNA の全体に占める割合が ALS では有意に増大した (Figure 6)。

Figure 4. Distribution of total RNA concentration

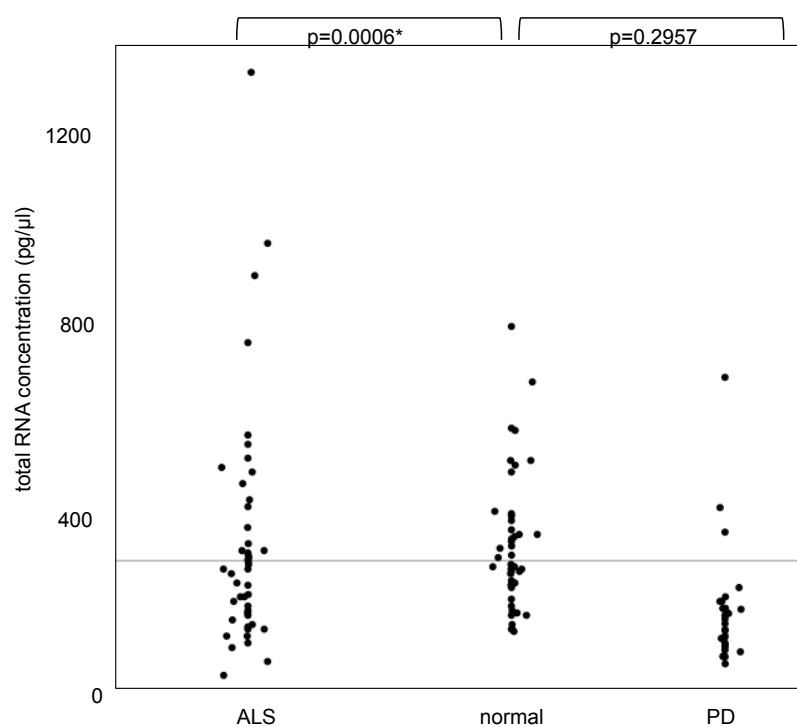


Figure 5. A scatterplot of disease duration from onset to end point and total RNA concentration, showing a negative correlation ($r = -0.385$, $p = 0.0267^*$).

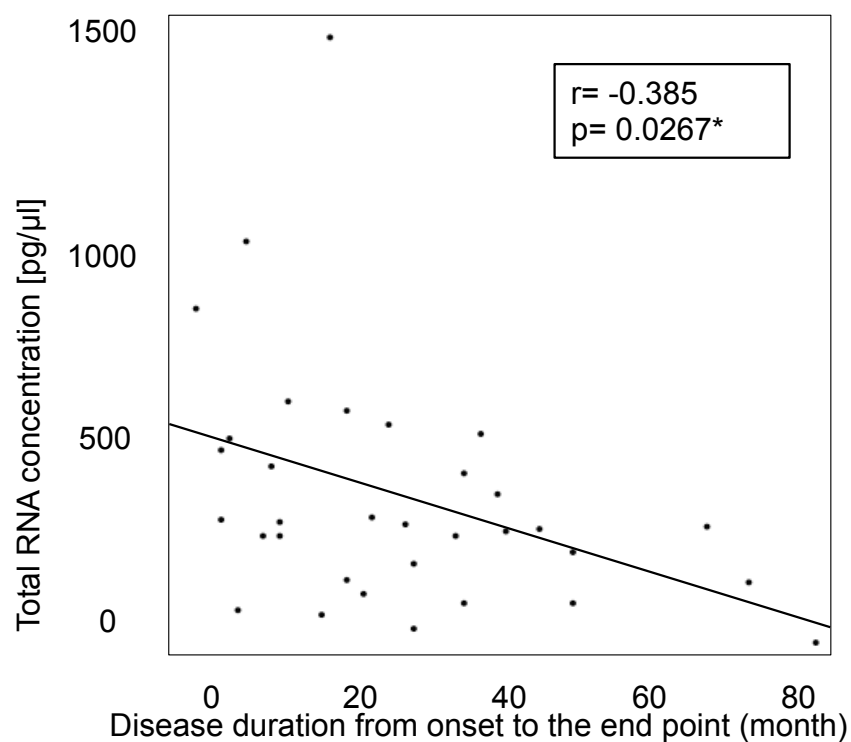
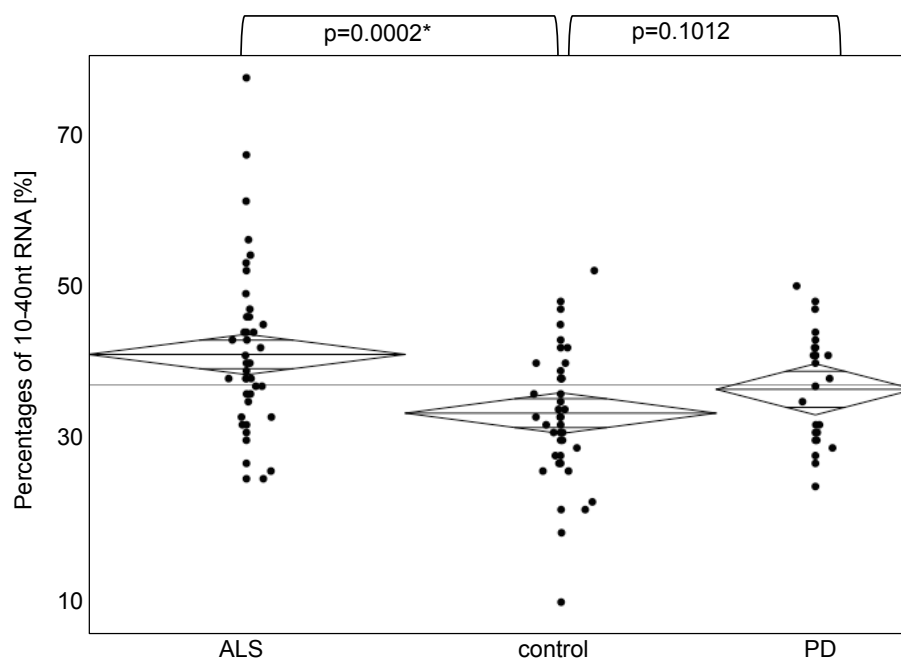


Figure 6. Percentages of 10-40nt RNA including miRNA that were significantly increased in ALS ($p = 0.0002^*$).



4. マイクロアレイを用いた網羅的解析によるバイオマーカー候補及び内在性コントロール候補となる microRNA の抽出

3D-Gene®マイクロアレイシステムを用いて 1800 種のヒト miRNA に対して網羅的に検出, 解析を行った. ALS 患者血漿中において, 3 種の miRNA が有意に増加, かつ十分な検出量で検出された. 一方で, 有意に減少した miRNA は 120 種存在し大変数が多かった. 我々はその後のリアルタイム PCR を用いた validation cohort において検証が実行可能な miRNA として fold change ratio が 0.5 未満のもので, コントロール血漿において十分な検出量のある miRNA として上位 6 種の miRNA を検出した(Table2).

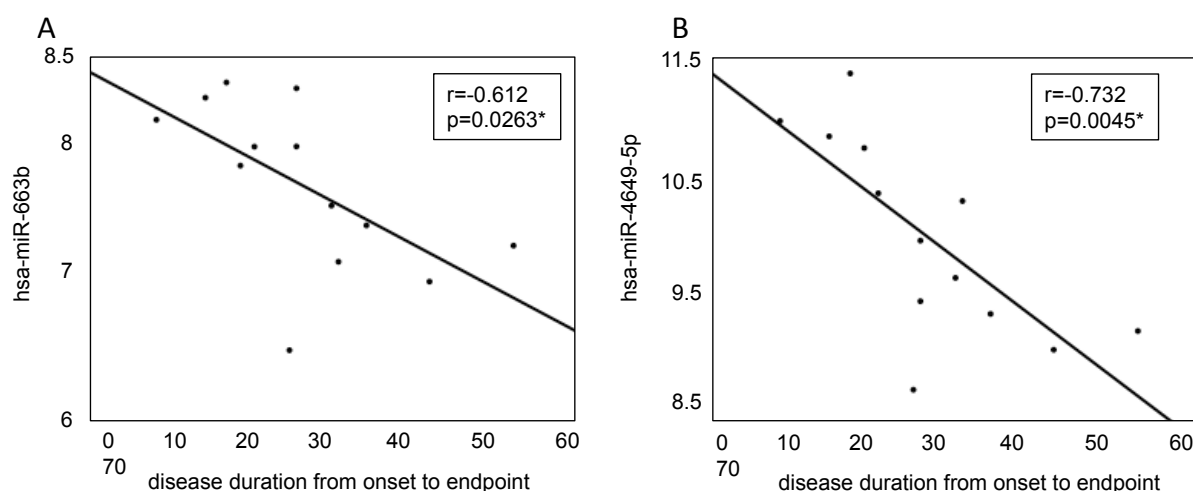
Table 2. Up- or down regulated miRNAs using microarray analysis and extraction of an internal control.

Differential expression type	MiRNA name	Fold change	Student <i>t</i> -test	p value Wilcoxon sum ranked test
Up-regulated	hsa-miR-4258	1.109	<0.0001*	0.0001*
	hsa-miR-663b	1.117	0.0004*	0.0017*
	hsa-miR-4649-5p	1.045	0.0659	0.179
Down-regulated	hsa-miR-26b-5p	0.374	<0.0001*	0.0001*
	hsa-miR-4299	0.435	0.0001*	0.0006*
	hsa-let-7f-5p	0.464	<0.0001*	0.0002*
	hsa-miR-4419a	0.464	0.0001*	0.0002*
	hsa-miR-3187-5p	0.485	0.0002*	0.0001*
	hsa-miR-4496	0.495	0.0003*	0.0011*
Candidates of Internal control	hsa-miR-4516	0.999	0.9340	

* $p < 0.05$

これらの特に有意に増加, 減少した miRNA に対して, 臨床所見と併せて多変量解析を施行したところ, hsa-miR-663b 及び hsa-miR-4649-5p の 2 種の増加した miRNA は, 発症からエンドポイント=観察終了時(死亡ないしは永続的な侵襲的陽圧換気の開始)に至るまでの病期との間に負の相関を認めた (hsa-miR-663b; $r = -0.612$, $p = 0.0263^*$, hsa-miR-4649-5p; $r = -0.732$, $p = 0.0045^*$) (Figure 7).

Figure 7. Scatterplots of disease duration from onset to end point (X) and miRNAs quantified with microarray system (Y) from the discovery cohort. (A) Y; hsa-miR-663b, (B) Y; hsa-miR-4649-5p



我々はまた, リアルタイム PCR による検証に先立ち, マイクロアレイ解析において安定した検出量を持ち, 最も分散が小さく, ALS 群とコントロール群間において平均値に差異を認めない miRNA を内在性コントロールとして検討し, hsa-miR-4516 に決定した (Table 2).

5. リアルタイム PCR 法を用いたバイオマーカー候補 microRNA の測定

リアルタイム PCR によって得られた miRNA の値の信用性については、各々のサンプルに予め抽出の段階で一定量の spike in control (cel-miR-39-3p) を入れ、そのリアルタイム PCR を合わせて行い回収率を求めた。いずれのサンプルにおいても満足のおける回収率を認めた。この spike in control 及び先に述べた Bioanalyzer2100®の結果からそれぞれの miRNA のコピー数を計算することも可能であったが、その計算に含まれる要素の増加を考慮し、先に決定した内在性コントロールとしての hsa-miR-4516 が他の miRNA と比較しても十分な量と安定した挙動を示したため hsa-miR-4516 を基準とした比較定量を中心に行う方向とした。

Discovery cohort を用いたマイクロアレイ解析において増加傾向が認められた miRNA のうち、hsa-miR-4649-5p は validation cohort を用いたリアルタイム PCR においても、ALS 患者で有意な増加を認めた (比較定量による相対比は 1.532, $p = 0.0009$)(Table 3)。一方で hsa-miR-4258, hsa-miR-663b についてはマイクロアレイ解析では有意に増加が認められていたものの、リアルタイム PCR においてはその傾向は再現されなかった。Discovery cohort を用いたマイクロアレイ解析において減少傾向が認められた miRNA では、hsa-miR-4299 が validation cohort を用いたリアルタイム PCR においてもまた有意に減少した(比較定量による相対比は 0.026, $p = 0.0001^*$)。一方で hsa-miR-26b-5p, hsa-let-7f-5p では減少が再現されなかった。hsa-miR-4419a, hsa-miR-3187-5p, hsa-miR-4496 に関してはリアルタイム PCR においてプライマーダイマーを形成してしまい、サンプルを投入しない場合でも非特異的な増幅を繰り返してしまい意味のある値を回収できなかった。また、疾患コントロールとして年齢、性別に有意差を認めないパーキンソン病患者群を設計し用いたが、hsa-miR-4649-5p 及び hsa-miR-4299 はパーキンソン病患者において ALS に認めたような有意な増加及び減少は認めなかった。一方で hsa-miR-663b はパーキンソン病患者において有意な増加を認めた (比較定量による相対比は 1.328, $p = 0.0094^*$)。

有意差を認めた miRNA に関し、ROC curve を求めたところ、hsa-miR-4649-5p と hsa-miR-4299 は比較的高い AUC 値を示した(hsa-miR-4649-5p; AUC = 0.696, hsa-miR-4299; AUC = 0.728)(Figure 8A,B)。

また、リアルタイム PCR の結果に対して、各種臨床情報 (年齢、性別、諸初症状、発症から採血までの時間、発症からエンドポイントまでの病期、ALSFRS-R、ALSFRS-R における球麻痺スコア)について多変量解析を施行したところ、hsa-let-7f-5p は ALSFRS-R における球麻痺スコアとの間に負の相関を認めた ($r = -0.478$, $p = 0.0006^*$) (Figure 9A)。更に hsa-let-7f-5p は、初発症状が四肢から始まる spinal-onset の患者群では、bulbar-onset の患者群と比較し有意に減少を認めた(Figure 9B)。一方で、マイクロアレ

イ解析において hsa-miR-663b 及び hsa-miR-4649-5p は、発症からエンドポイントまでの病期との間に相関関係は認めなかった。

Validation cohort で抽出した患者のうち 7 人においては、初回の採血の後、6 ヶ月ないし 12 ヶ月の間隔を空けて最長 24 ヶ月までの長期的な採血のフォローアップができた。2 回目以降の採血については validation cohort 内には含めないが、それぞれの miRNA について比較検討したところ、hsa-miR-663b は個々の患者において時系列毎に上昇する傾向を認めた。これは spike-in control 及び総 RNA 濃度を用いて計算したコピー数でも同様の傾向を確認し得た(Figure 10A, B)。

Table 3 The comparison of up- or down- regulated miRNAs between ALS and healthy controls using qPCR.

differential expression type	MiRNA name	relative expression†	p value
Up-regulated	hsa-miR-4258	0.990	0.4605
	hsa-miR-663b	1.090	0.9935
	hsa-miR-4649-5p	1.532	0.0009*
Down-regulated	hsa-miR-26b-5p	1.095	0.6574
	hsa-miR-4299	0.026	0.0001*
	hsa-let-7f-5p	1.105	0.6508

* $p < 0.05$

† Average of the expression level of internal control (hsa-miR-4516) = 1

Figure 8 The miRNAs significantly expressed in the validation cohort.

- (A) The ROC curve of hsa-miR-4649-5p and ALS/control, where the AUC value was 0.696.
 (B) The ROC curve of hsa-miR-4299 and ALS/control, where the AUC value was 0.728.

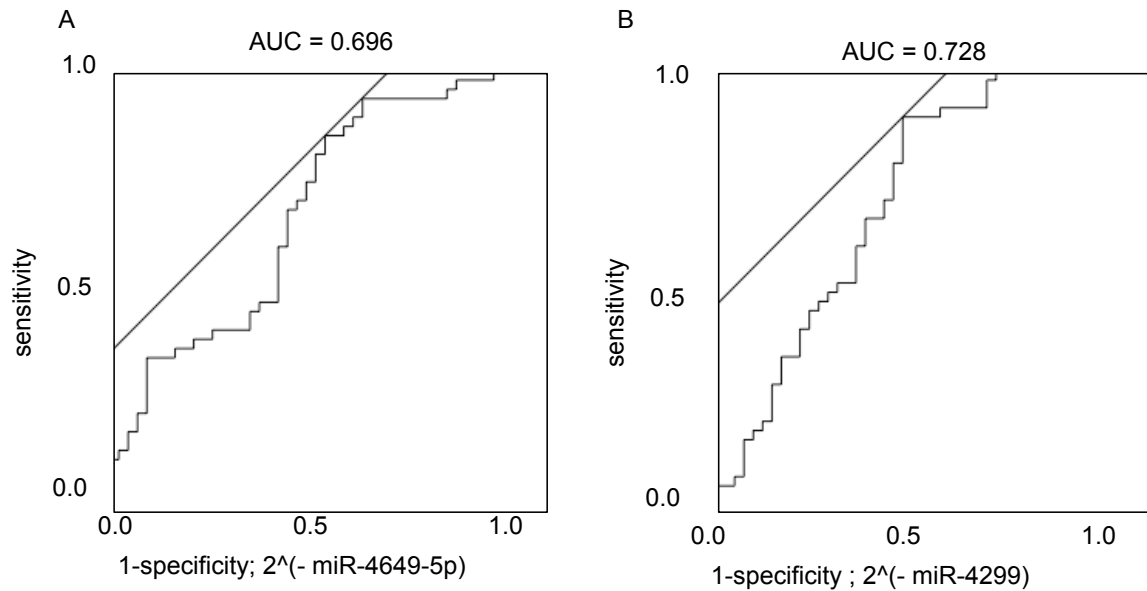


Figure 9 Hsa-let-7f-5p showed relation with spinal symptoms.

- (A) The negative correlation of hsa-let-7f-5p with bulbar paralysis scores of ALSFRS-R.
 (B) Showing hsa-let-7f-5p as decreasing more in spinal-onset patients than in non-spinal-onset patients.

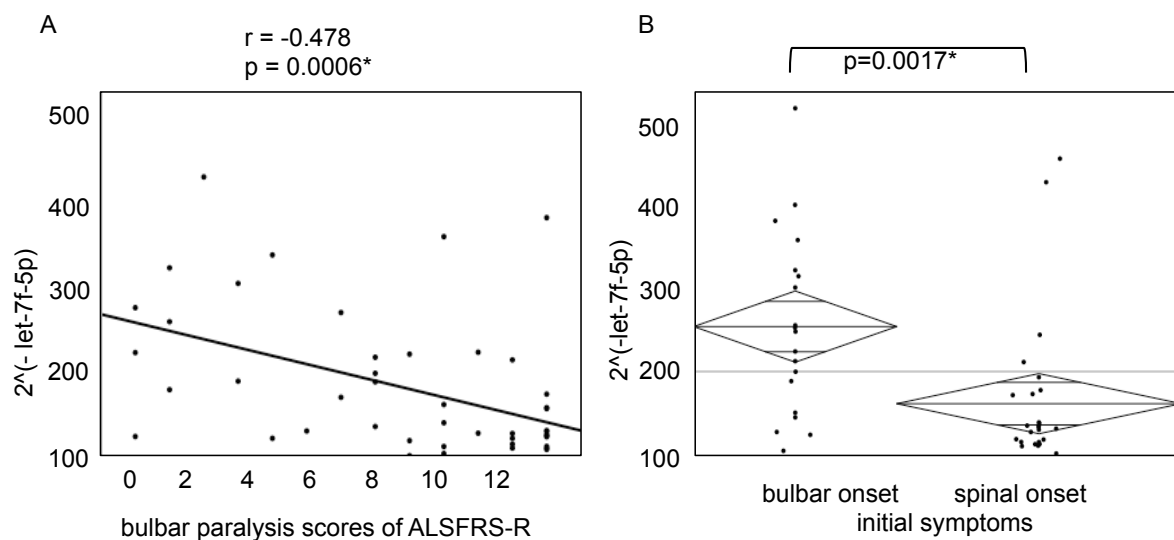
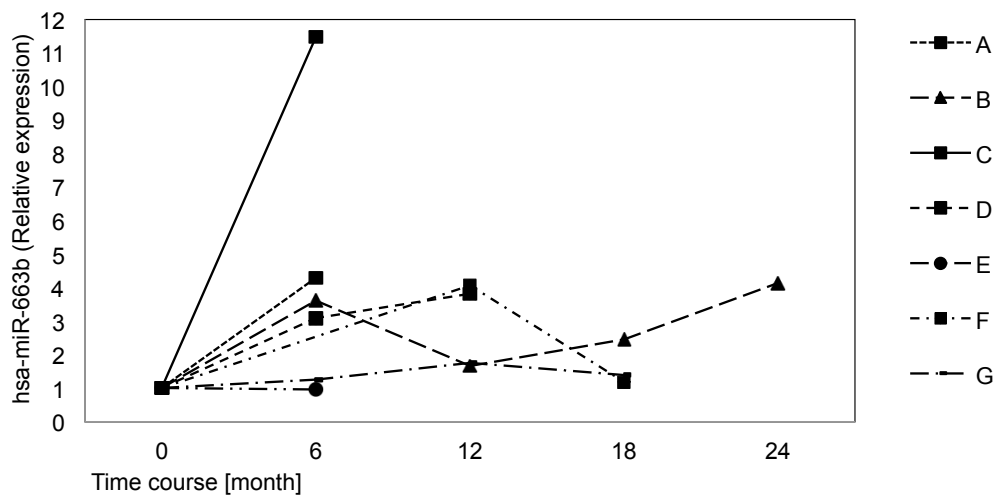


Figure 10 Hsa-miR-663b increased in the time course.

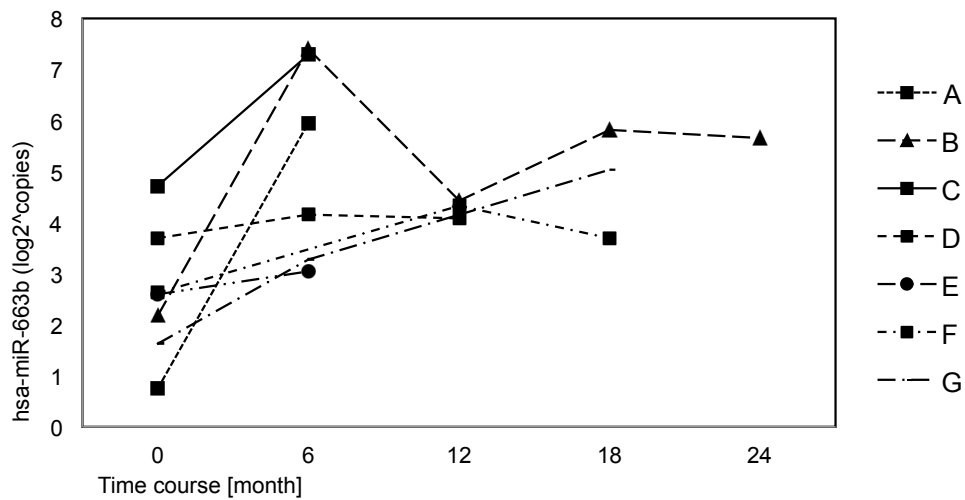
(A) The 7 patients we were able to follow over time, and hsa-miR-663b showing an increase over time. Relative expressions are shown as the first collection standard.

(B) Calculated copy numbers of hsa-miR-663b showed increases over time.

A



B



6. miRNA のターゲット遺伝子の予測及び生物学的プロセスの分析

それぞれの miRNA のターゲット遺伝子を miRmap (<http://mirmap.ezlab.org>) を用いて予測し (Table 4), その上位 50 種について MetaCoreTM (portal.genego.com/, Thomson Reuters Inc., Carlsbad, CA)を用い, In silico による生物学的ネットワーク解析, 遺伝子オントロジープロセス解析を施行した. その上位 10 プロセスについて Table 5,6 にそれぞれ提示する.

Table 4 The most predictable target genes found by miRmap.

	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-4299	hsa-miR-4649-5p	hsa-miR-663b
1	HMGA2	SOGA1	TPPP	PAX5
2	C14orf28	COL4A3BP	POFUT2	ITSN1
3	LIN28B	RBM25	R3HDM4	ZNF436
4	FIGN	PCYT1A	ROBO2	TTC28
5	NAA30	SEC63	DCLK1	OLFML2A
6	ONECUT2	SLC22A23	DLG4	LMX1B
7	DIAPH2	PRKCA	HS2ST1	DCX
8	PRTG	POU3F3	CAMK1G	TNS3
9	NAP1L1	GALNT10	NOL6	AMZ1
10	NR6A1	C14orf118	TMEM30B	ICMT
11	SMARCAD1	PDCD2	MAP1A	STXBP5L
12	LIMD2	MACC1	PTGFRN	PAFAH2
13	CLCN5	SLC35B4	CAMSAP1	ADRA2A
14	STARD9	LIN7A	FAM73B	PALM2-AKAP2
15	TRIM71	NLGN1	PTGDR2	DNAH10OS
16	YOD1	DIP2C	CREB3L2	GRHL2
17	MIB1	SLC24A4	C1QL4	FREM1
18	PAWR	ADAL	AC011298.2	TCTE1
19	SFMBT1	PDIK1L	ZNF385A	ATP6V0A2
20	SMC1A	RNF165	DYNLRB1	NIPSNAP1
21	MMS22L	EPHA4	TOLLIP	CLCN5
22	PRLR	NKAIN1	MIDN	NTNG2
23	NDUFA4	AP3M2	MBOAT2	PPP1R12B
24	DCLRE1B	EPB41	TRPM8	SMPD3
25	HDX	C20orf112	SET	PRKAB2
26	GDAP2	ERC1	EPHA4	RAB11FIP4
27	MFSD8	ARHGAP32	P2RX3	NPTXR
28	PARD6B	GPR85	TUBB	UNC45B
29	ATPAF1	SLIT3	C21orf119	SLC6A20
30	USP44	GGA3	EARS2	CMC1
31	C1orf21	ATP9A	SNX11	SHROOM3

32	IGF1R	MACF1	WWC2	TNFSF11
33	NIPA1	TMEM178B	na	TAOK1
34	MBD2	COX7A2L	na	ATRNL1
35	XKR8	NSFL1C	na	DERL1
36	GATM	KLHL6	na	GZF1
37	SREK1	FAM216B	na	NCS1
38	BEND4	LRRC55	na	USP47
39	C5orf51	PGAP1	na	OPHN1
40	POU2F1	STAT5B	na	FAM212B
41	PDE12	TMEM132B	na	CCDC43
42	TTC26	FAM210B	na	C1orf173
43	BACH1	TNRC6B	na	MIB1
44	ERO1L	SRRM4	na	WDR48
45	ZNF275	CLIP1	na	VCPIP1
46	NYNRIN	GALNT6	na	TBC1D16
47	USP38	TRIM24	na	ATP11A
48	PXT1	ATXN1	na	EHD3
49	GPR26	SARM1	na	AVL9
50	SLC5A9	MRVI1	na	URB1

Table 5 Results of process network analysis from Metacore™.

Process Network from Metacore™				
miRNA		Processes	pValue	FDR†
hsa-miR-4649-5p	1	Cytoskeleton_Cytoplasmic microtubules Cell adhesion_Integrin-mediated	1.29E-04	4.64E-03
	2	cell-matrix adhesion Development_Neurogenesis_Axonal	1.37E-03	1.81E-02
	3	guidance	1.79E-03	1.81E-02
	4	Cytoskeleton_Spindle microtubules	2.01E-03	1.81E-02
	5	Muscle contraction Cell adhesion_Attractive and repulsive	7.39E-03	4.43E-02
	6	receptors Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton	7.63E-03	4.43E-02
	7	rearrangement	8.63E-03	4.43E-02
	8	Transport_Calcium transport	9.84E-03	4.43E-02
	9	Development_Regulation of angiogenesis	1.48E-02	5.57E-02
	10	Cytoskeleton_Intermediate filaments	1.55E-02	5.57E-02
hsa-miR-663b	1	Development_Neurogenesis in general Neurophysiological	1.15E-03	4.00E-02
	2	process_Transmission of nerve impulse Proliferation_Positive regulation cell	1.66E-03	4.00E-02
	3	proliferation Cardiac development_Wnt_beta-catenin,	1.94E-03	4.00E-02
	4	Notch, VEGF, IP3 and integrin signaling	5.87E-03	8.41E-02
	5	Cell adhesion_Platelet aggregation Development_Neurogenesis_Axonal	6.78E-03	8.41E-02
	6	guidance	1.88E-02	1.94E-01
	7	Reproduction_Male sex differentiation Signal Transduction_Cholecystokinin	2.24E-02	1.99E-01
	8	signaling Muscle contraction_Nitric oxide signaling	2.86E-02	2.22E-01
	9	in the cardiovascular system	3.81E-02	2.47E-01
	10	Translation_Regulation of initiation	3.98E-02	2.47E-01

hsa-miR-4429	1	Cell adhesion_Attractive and repulsive receptors	4.34E-04	2.56E-02
	2	Cell adhesion_Amyloid proteins	7.12E-04	2.56E-02
	3	Development_Regulation of angiogenesis	1.30E-03	2.69E-02
	4	Development_Neurogenesis_Axonal guidance	1.50E-03	2.69E-02
	5	Signal transduction_Oxytocin signaling	4.00E-03	4.83E-02
	6	Development_Neurogenesis_Synaptogenesis	4.34E-03	4.83E-02
	7	Cell adhesion_Synaptic contact	4.70E-03	4.83E-02
	8	Cell cycle_G1-S Growth factor regulation	5.77E-03	5.19E-02
	9	Inflammation_IL-2 signaling	6.80E-03	5.44E-02
	10	Development_Hemopoiesis, Erythropoietin pathway	1.41E-02	9.49E-02
hsa-let-7f-5p	1	Protein folding_ER and cytoplasm	5.93E-03	2.46E-01
	2	Cell cycle_Mitosis	1.12E-02	2.46E-01
	3	Cell adhesion_Leucocyte chemotaxis	1.61E-02	2.46E-01
	4	Reproduction_Male sex differentiation	2.60E-02	2.99E-01
	5	Protein folding_Folding in normal condition	3.91E-02	3.23E-01
	6	DNA damage_Checkpoint	4.22E-02	3.23E-01
	7	Cell cycle_S phase	5.86E-02	3.61E-01
	8	Apoptosis_Apoptotic nucleus	6.57E-02	3.61E-01
	9	Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals via MAPK and JAK/STAT	8.08E-02	3.61E-01
	10	Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement	8.39E-02	3.61E-01

† FDR; false discovery rate

Table 6 Results of Gene Ontology analysis from Metacore™.

GO Process from Metacore™				
miRNA		Processes	pValue	FDR†
hsa-miR-4649-5p	1	protein complex assembly	5.97E-07	6.90E-04
	2	protein complex biogenesis	6.13E-07	6.90E-04
	3	protein polymerization	9.57E-07	6.90E-04
	4	regulation of astrocyte differentiation	1.22E-06	6.90E-04
		cellular component organization or		
	5	biogenesis	1.28E-06	6.90E-04
	6	neuron recognition	2.28E-06	7.78E-04
	7	single-organism behavior	2.39E-06	7.78E-04
	8	behavior	2.62E-06	7.78E-04
		central nervous system neuron		
	9	development	2.83E-06	7.78E-04
	10	positive regulation of penile erection	2.89E-06	7.78E-04
hsa-miR-663b		phospholipase C-activating dopamine		
	1	receptor signaling pathway	1.91E-06	2.73E-03
		adenylate cyclase-inhibiting adrenergic		
	2	receptor signaling pathway	5.26E-06	2.73E-03
		phospholipase C-activating adrenergic		
	3	receptor signaling pathway	5.26E-06	2.73E-03
	4	localization	5.46E-06	2.73E-03
		central nervous system neuron		
	5	development	7.52E-06	3.01E-03
		negative regulation of uterine smooth		
	6	muscle contraction	1.58E-05	5.25E-03
		activation of MAPK activity by		
	7	adrenergic receptor signaling pathway	3.15E-05	7.86E-03
		negative regulation of adrenergic receptor		
	8	signaling pathway	3.15E-05	7.86E-03
	9	thermoception	5.24E-05	1.05E-02
		epidermal growth factor-activated		
	10	receptor transactivation by G-protein	5.24E-05	1.05E-02

		coupled receptor signaling pathway		
hsa-miR-4299	1	regulation of synapse assembly	2.09E-10	4.68E-07
	2	regulation of synapse organization	5.32E-09	5.96E-06
	3	regulation of synapse structure or activity	9.97E-09	7.46E-06
		positive regulation of dense core granule		
	4	biogenesis	1.65E-08	9.23E-06
		central nervous system neuron		
	5	development	2.12E-08	9.52E-06
	6	positive regulation of synapse assembly	4.57E-08	1.71E-05
		regulation of dense core granule		
	7	biogenesis	6.57E-08	2.11E-05
		central nervous system neuron		
	8	axonogenesis	8.69E-08	2.44E-05
	9	histone H3-T6 phosphorylation	1.64E-07	4.09E-05
	10	desmosome assembly	3.27E-07	7.34E-05
hsa-let-7f-5p		positive regulation of smooth muscle cell		
	1	chemotaxis	4.68E-08	6.51E-05
		regulation of smooth muscle cell		
	2	chemotaxis	1.17E-07	8.12E-05
	3	bleb assembly	6.42E-06	2.74E-03
	4	cellular component assembly	1.09E-05	2.74E-03
		negative regulation of establishment of		
	5	endothelial barrier	1.58E-05	2.74E-03
		positive regulation of establishment of		
	6	endothelial barrier	1.58E-05	2.74E-03
		positive regulation of endothelial cell		
	7	development	1.58E-05	2.74E-03
		negative regulation of endothelial cell		
	8	development	1.58E-05	2.74E-03
		positive regulation of Rho protein signal		
	9	transduction	2.29E-05	3.54E-03
		regulation of establishment of endothelial		
	10	barrier	3.15E-05	3.76E-03

† FDR; false discovery rate

考察

A. miRNA 測定の標準化及び実験計画の作成

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。

実験の対照を選ぶに当たり、問診上神経筋疾患の家族歴のある患者はあらかじめ除外した。現在家族性 ALS として比較的報告の多い遺伝子変異の多くが常染色体優性遺伝形式であるが、C9orf72 繰り返し伸長の変異については孤発例でも多く報告されているため repeat primed PCR を施行し確認した。同変異は欧米では最も多い変異であるが、一般にアジア、特に日本では報告が少なく、1 例も陽性者が居なかったことは既報の多くと矛盾しないと考えられる。

循環環境における miRNA を評価する上では、複数の考慮すべき点が存在する。まず、細胞内環境とは異なり、恒常的に安定して存在する内在性コントロール、所謂 house keeping gene が規定できていない。次に、miRNA それ自体の分子量が非常に小さいため、spike-in control と比較する上でも、その spike-in control 自体の濃度はごく薄く調整する必要がある、かつ正確に測定する必要がある。さらに、単純に spike-in control と個々の miRNA との濃度を比較するためには、total RNA 濃度そのものがサンプル間でほぼ等しいという条件が必要となる。これはマイクロアレイ解析における正規化法においても、サンプル間で全 miRNA の濃度分布に大きな差がないことが条件と言え、同様の前提が必要と言える。マイクロアレイ解析そのものにも弱点はあり、通常その時点でデータベースにおいて公表される全種の miRNA が解析の対象となる。しかしながら、その蛍光強度には検出限界があり、一定以下の薄い miRNA についてはその増加及び減少は十分評価できない。我々はこの二種類の測定法を用いて、双方に共通して増加、減少した挙動を認める miRNA が最もバイオマーカー候補となるにふさわしい miRNA であると考えた。また、抽出した総 RNA 量を測定し、更に spike-in control を用いこの定量の質に関して問題がないと確認した。リアルタイム PCR 自体は内在性コントロールを用いて測定した。我々はその内在性コントロールには hsa-miR-4516 を選択したが、その理由として常に安定して検出するに十分な蛍光量を示し、分散が少なく、ALS 及び健常コントロールの間で差を認めないためこれを選択した。

網羅的なマイクロアレイ解析においては、増加した miRNA は少なく、しかし有意な減少を示した miRNA は多数 (おおよそ 120 種) 存在した。我々はこの中からリアルタイム PCR による検証を考慮し fold change が 0.5 未満となり、かつ正常対照群で安定し

て検出される上位 6 種の miRNA をバイオマーカー候補として選択した。

B. 抽出後 RNA の評価と動態に関する考察

ALS の遺伝子の多くに、RNA のプロセッシングに関する異常が示唆されている。特に heterogeneous nuclear RNA (hnRNP) クラスに属するタンパクをコードする遺伝子は ALS の病理及び病態への関与が報告されている (TARDBP , FUS, hnRNPA2B1, and hnRNPA1) ¹⁹。例としては TDP-43 (43-kDa TAR DNA-binding protein, *TARDBP*) は miRNA の成熟に必要となる Drosha 及び Dicer と協調的に機能すると指摘されている ³³。抽出した RNA の分布の差は、ALS における RNA 代謝の異常を表現している可能性が考えられ、実際に 10-40 nt の RNA の分画成分は ALS ではその割合が増加し、また病期の長短にも影響を受けた。一方で明らかに増加した miRNA はわずかであり、このことについてはいくつかの仮説が考えられる。ALS 患者血漿には未知かつ新規の miRNA が存在するといった考えや、ALS 病態の中で RNA の代謝異常に伴い不適切に切り出され分泌された結果としての miRNA 以外の機能性あるいは非機能性の小分子 RNA が存在しするといった可能性である。

C. 増加及び減少した miRNA に関する評価

既報の ALS に関する循環環境中からの miRNA の検出を行う研究は少なく、またその患者及びコントロールの規模に関しても少数である。hsa-miR-338-3p は ALS 患者の白血球、血清、CSF、脊髄において増加が報告されている ^{37,38}。また、hsa-miR-1234-3p と、hsa-miR-1825 は ALS 患者の血清において減少が報告されている ³⁹。我々の解析では hsa-miR-338-3p は明らかな増加は示さなかった (fold change 0.622; Student's *t* test における p 値 0.112)。増加したとする既報においては、まず白血球を用いて網羅的な解析を行った後に、血清から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR 法にて個別の miRNA について増加の蛍光が ALS 患者間にあるかを確認しており、この手法の差により先行する研究を再現しなかったものと考えられた。また、我々の形跡では hsa-miR-1234-3p は減少傾向となり、hsa-miR-1825 は有意に減少を認めた (fold change 0.665; Student's *t* test における p 値 0.017*)。しかし、fold change に対するカットオフ値を我々はより低い値に絞り込んだためにそれ以上の解析対象とならなかった。

Hsa-miR-4649-5p はマイクロアレイ解析及びリアルタイム PCR の双方において増加を認めた miRNA である。統計学的にはマイクロアレイ解析では有意差は認めなかったものの、病期との間に強い負の相関を示し、バイオマーカー候補として validation cohort を用いたリアルタイム PCR を行う価値があると考えられた。Student's *t* test の p 値については差異そのものと、サンプル数に依存する。また、今回 discovery cohort の

年齢、性別に関して ALS とコントロールの間に存在する差が影響したと考えられた。この miRNA は、7 番染色体上の AEBP1 遺伝子上にある 12 番イントロンから転写される。AEBP1 タンパク質は転写の抑制機能を持つと推測されており、脂肪産生や平滑筋の分化に寄与し、脳によく発現することが指摘されている (miRIAD, www.bioinfo.mochsl.org.br/miriad)。

hsa-miR-4649-5p のターゲット遺伝子群の機能としては、主に微小管形成、細胞接着、軸索誘導、中枢神経の成長に関するものが多く予測され、この miRNA 単独で見てもその増加は中枢及び末梢の神経変性を起こす ALS の病態と関連する可能性を強く考えさせられる組み合わせと言える (Table 4,5,6 を参照)。

hsa-miR-663b は ALS 患者血漿においてマイクロアレイでは増加を認め、またリアルタイム PCR においては全体では増加の再現はなかったものの、同一患者の時系列における増加を認めた。更に、リアルタイム PCR における疾患コントロール群であるパーキンソン病患者の血漿で有意に増加を認めた。この hsa-miR-663b は 2 番染色体から転写され、この部位は特定の遺伝子のイントロンではない。また、臓器毎の検討では脳における強い発現が指摘されている。ターゲット遺伝子群の機能として、process network 解析ではニューロンの発生、神経インパルスの伝導、細胞増殖の調節機能が指摘され、また遺伝子オントロジー (GO; Gene Ontology) process ではドパミン、アドレナリンレセプターを介するシグナル経路の賦活あるいは抑制、及びニューロンの発達が予測された。このことは、hsa-miR-663b の増加は ALS の病期後半の段階の運動ニューロンへのダメージをより深刻とする可能性が示唆すると思われる。

hsa-miR-4649-5p 及び hsa-miR-663b はいずれも、マイクロアレイ解析において発症からエンドポイントまでの病期との間に負の相関関係を認めたが、リアルタイム PCR においてはその特徴は再現されなかった。しかし、抽出後の総 RNA の濃度は病期との間に負の相関を示していた。マイクロアレイ解析では常に 300 µl の血漿から抽出した RNA の半量を使用して解析しており、総 RNA 濃度の影響を受けていたのではないかと考えられた。

hsa-let-7f-5p は古くより知られており、また種を越えて幅広く確認されている let-7 ファミリーの miRNA である。これもまた、イントロン由来ではない miRNA であり、脳を含む多数の臓器での発現が確認されている。ターゲット遺伝子群の機能としては、process network 解析ではタンパク質の折りたたみ、細胞有糸分裂、細胞接着、また、GO process では平滑筋細胞の走化性への陽性の調節機能等が予測された。hsa-let-7f-5p は初発症状が spinal-onset である患者で特に減少しており、また球麻痺スコアとの間に負の

相関を認めた。このことはこの miRNA と筋肉量の間の関連を示唆している。discovery cohort における spinal-onset が初発症状である患者は validation cohort のそれに比べてかなり割合として多く (81%) , リアルタイム PCR において有意差をもたらした可能性がある。

hsa-miR-4299 は 11 番染色体から転写され、イントロン由来の miRNA ではない。ターゲット遺伝子群の機能としては、process network 解析では細胞接着、血管新生の調節、軸索誘導があげられており、また GO process ではシナプスアセンブリー、シナプス編成、シナプスの構造決定、シナプスの活動性、歯状核の発生の調整、中枢神経組織の発達など極めて多数の神経組織と直接関連がある遺伝子オントロジーが予測された。

hsa-miR-4299 についてはまた、興味深い既報がある。ALS 患者の FFPE (formalin-fixed paraffin embedded) 標本の運動領域からは 364 種の miRNA が見いだされたが、91 種は増加し、233 種は減少を認めた⁴⁰。これは全体の平均値であり、統計学的有意差については言及されていない。hsa-miR-4299 はその中で最も増加している miRNA の一群に属していた⁴⁰。我々が血漿より抽出した RNA による hsa-miR-4299 は、その反対の結果となっており、マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR の双方で明らかに有意に減少していた。FFPE 標本は神経細胞、グリア細胞、内皮細胞などの細胞であり、細胞内環境を反映していると考えられる。血漿 miRNA は細胞から細胞外へ分泌され、循環環境中に存在している。hsa-miR-4299 の、この対立する結果となる表現は、細胞内か、分泌された細胞外に存在するものであるかが大きく影響していると考えられる。また、この現象にはいくつか仮定も検討される。ALS の進行を調整する機構として神経細胞の内部で代償的に増加し機能している、あるいは miRNA の分泌に病的な変化が生じているなどである。

前述する miRmap によって予測される miRNA のターゲット遺伝子の中には、共通して予測される遺伝子が存在する。EPHA4 は hsa-miR-4649-5p と hsa-miR-4299 に共通して発現する注目すべき遺伝子である。EPHA4 は ALS の動物モデル及びヒトの ALS 患者の脳組織の双方で正常に比較し高い発現が指摘されており、ALS の疾患調整遺伝子である可能性が指摘されている。その発現は ALS の発現時期及び生存期間と負の相関を認めている。また、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と軸索変性が改善することが報告されている⁴¹。hsa-miR-4649-5p と hsa-miR-4299 の増加は EPHA4 の抑制につながるため、神経死への対抗的な機能となり得ると考えられる。一方で、hsa-miR-4299 は血漿で極めて減少してしまうのだが、これは病態を悪化させ得る因子である。将来的にはこういった疾患調整遺伝子を調節する miRNA を人工的に合成した核酸試薬による疾患への修飾や、もしくは miRNA の

パスウェイに介入することで, ALS の進行を緩和する治療につなげられる可能性がある.

総括及び結論

- A. Discovery cohort である 16 例の孤発性 ALS 群, 10 例の健常対照群に対し miRNA に対する網羅的なマイクロアレイ解析を行った. 3 種の増加した miRNA 及び 6 種の特に減少した miRNA をバイオマーカー候補とした.
- B. 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.
- C. 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. 10-40 ntRNA 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.
- D. 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.
- E. hsa-miR-4649-5p 及び hsa-miR-4299 は in silico による生物学的解析において, 神経系のパスウェイと強い関わりを示唆され, 特に, 過去に ALS の disease modifier と指摘された EPHA4 を共通してターゲットにするなど, 疾患進行の抑制にも有用である可能性が考えられる.

謝辞

本論文を終えるにあたり、研究の機会を与えていただき、ご指導、ご鞭撻をいただきました北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野教授 佐々木秀直先生、同准教授 矢部 一郎先生に深謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり多大なご協力を頂きました、がん研究会 内海 潤先生、帯広厚生病院神経内科 保前 英希先生、同 堀内 一宏先生、市立函館病院神経内科 佐藤 和則先生、北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野 加納 崇裕先生、同 廣谷 真先生、同 中野 史人先生、同 松島 理明先生、白井 慎一先生、上床 尚先生、研究員の浜 結香様、木村 麻利様に心より感謝申し上げます。

更に、本研究には多くの患者、家族の方々のご協力を頂いたからこそ行い得たものであり、すでに他界されている患者の方の割合が疾患の特性上大変多いのですが、貴重なお時間を私の研究のために割いてご協力頂きましたことに深く感謝の言葉を申し上げます。

引用文献

- 1 Chio, A. *et al.* Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* **41**, 118-130 (2013).
- 2 Byrne, S. *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **82**, 623-627 (2011).
- 3 Kumar, D. R., Aslinia, F., Yale, S. H. & Mazza, J. J. Jean-Martin Charcot: the father of neurology. *Clin. Med. Res.* **9**, 46-49 (2011).
- 4 Kiernan, M. C. & Turner, M. R. Lou Gehrig and the ALS split hand. *Neurology* **85**, 1995 (2015).
- 5 Ni, M. Y. *et al.* Transmissibility of the Ice Bucket Challenge among globally influential celebrities: retrospective cohort study. *BMJ* **349**, g7185 (2014).
- 6 Miller, R. G. *et al.* Quality improvement in neurology: amyotrophic lateral sclerosis quality measures: report of the quality measurement and reporting subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **81**, 2136-2140 (2013).
- 7 Ringholz, G. M. *et al.* Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **65**, 586-590 (2005).
- 8 Miller, R. G., Munsat, T. L., Swash, M. & Brooks, B. R. Consensus guidelines for the design and implementation of clinical trials in ALS. World Federation of Neurology committee on Research. *J. Neurol. Sci.* **169**, 2-12 (1999).
- 9 Chio, A. *et al.* Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol.* **13**, 1228-1240 (2014).
- 10 Geser, F., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: a spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology* **30**, 103-112 (2010).
- 11 Hasegawa, M. *et al.* Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **64**, 60-70 (2008).
- 12 Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17-23 (2013).
- 13 DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245-256 (2011).
- 14 Maruyama, H. *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223-226 (2010).
- 15 Abe, K. *et al.* Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of

- efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **15**, 610-617 (2014).
- 16 Wolf, J. *et al.* Factors Predicting Survival in ALS Patients - Data from a Population-Based Registry in Rhineland-Palatinate, Germany. *Neuroepidemiology* **44**, 149-155 (2015).
 - 17 Cedarbaum, J. M. *et al.* The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J. Neurol. Sci.* **169**, 13-21 (1999).
 - 18 Robelin, L. & Gonzalez De Aguilar, J. L. Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: myth or reality? *Biomed Res Int* **2014**, 525097 (2014).
 - 19 Guerreiro, R., Bras, J. & Hardy, J. SnapShot: Genetics of ALS and FTD. *Cell* **160**, 798 e791 (2015).
 - 20 Budini, M. & Buratti, E. TDP-43 autoregulation: implications for disease. *J. Mol. Neurosci.* **45**, 473-479 (2011).
 - 21 Donnelly, C. J. *et al.* RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* **80**, 415-428 (2013).
 - 22 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
 - 23 Mattick, J. S. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* **5**, 316-323 (2004).
 - 24 Vella, M. C. & Slack, F. J. C. elegans microRNAs. *WormBook*, 1-9 (2005).
 - 25 Lewis, B. P. *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798 (2003).
 - 26 Denli, A. M. *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235 (2004).
 - 27 Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441 (2004).
 - 28 Krek, A. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495-500 (2005).
 - 29 Dueck, A. & Meister, G. Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes. *Biol. Chem.* **395**, 611-629 (2014).
 - 30 Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513-10518 (2008).
 - 31 Kong, Y. W., Ferland-McCollough, D., Jackson, T. J. & Bushell, M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* **13**, e249-258 (2012).
 - 32 Haramati, S. *et al.* miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13111-13116 (2010).
- 33 Kawahara, Y. & Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3347-3352 (2012).
 - 34 Burgos, K. *et al.* Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS One* **9**, e94839 (2014).
 - 35 Lee, S. T. *et al.* miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Ann. Neurol.* **72**, 269-277 (2012).
 - 36 Mahoney, F. I. & Barthel, D. W. Functional Evaluation: The Barthel Index. *Md. State Med. J.* **14**, 61-65 (1965).
 - 37 De Felice, B. *et al.* A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene* **508**, 35-40 (2012).
 - 38 De Felice, B. *et al.* miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics* **15**, 243-253 (2014).
 - 39 Freischmidt, A. *et al.* Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* **36**, 2660 e2615-2620 (2015).
 - 40 Wakabayashi, K. *et al.* Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 173 (2014).
 - 41 Van Hoecke, A. *et al.* EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat. Med.* **18**, 1418-1422 (2012).