HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多系統萎縮症およびパーキンソン病における血漿中miRNA発現変化の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	上床, 尚
Description	配架番号：2506
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14043号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78272
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hisashi_Uwatoko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　上床　尚

学 位 論 文 題 名

多系統萎縮症およびパーキンソン病における血漿中 miRNA 発現変化の検討
(Study on plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease)

【背景と目的】多系統萎縮症は成人に発症する神経変性疾患で自律神経障害、小脳性運動失調症、パーキンソニズムを三大症候し、病理学的にはα-synuclein 陽性グリア細胞質内封入体や基底核、小脳、脳幹部を中心とした神経脱落で特徴づけられる。多系統萎縮症は、小脳性運動失調症が前景に立つ MSA-C (multiple system atrophy with predominant cerebellar ataxia)と、パーキンソニズムが前景に立つ MSA-P (multiple system atrophy with predominant parkinsonism)に大別され、MSA-C は日本で多く、MSA-P は欧米諸国や韓国で多いことが報告されている。多系統萎縮症の診断は、"The second consensus statement on the diagnosis of MSA" を用いて行うが、その診断感度は十分に高いとは言えず、多系統萎縮症の正確な早期診断にはしばしば難渋する。パーキンソン病は安静時振戦、筋強剛、動作緩慢、姿勢反射障害などの運動症状や多彩な非運動症状を呈する神経変性疾患であり、病理学的には中脳黒質緻密部のドパミン産生ニューロン脱落やα-synuclein 沈着で形成される Lewy 小体が特徴とされる。パーキンソン病は内服薬や深部脳刺激療法による症状改善が望めるが、多系統萎縮症の治療は十分に開発されていない。多系統萎縮症とパーキンソン病は症状の進行度や治療反応性が異なり、長期予後が大きく異なるが、病初期には類似した症状を呈し、両疾患の早期の鑑別が難しいことも少なくない。また、多系統萎縮症およびパーキンソン病は多因子疾患と考えられ、遺伝的因子、環境因子、エピジェネティクス因子などが複合的に関与していると考えらえるが、その発症機転は充分に解明されていない。そのため、早期診断および早期鑑別に有用なバイオマーカーの開発や病態を反映する因子の検索が望まれる。microRNA は 18-25 nt の低分子 1 本鎖 RNA であり、標的遺伝子の messenger RNA に相補的に結合して、messenger RNA の分解促進や翻訳阻害を引き起こす。microRNA は転写後の遺伝子発現抑制の中心的な役割を果たし、microRNA の発現や機能の障害が種々の病態に関与することが報告されている。また、悪性腫瘍、感染症、神経変性疾患などにおいて、microRNA の発現量が変動することが報告されており、診断バイオマーカーとしての有用性を期待されている。本研究では多系統萎縮症およびパーキンソン病の患者における、血漿中 microRNA 発現量の変化を解析し、バイオマーカーとしての有用性や病態との関連について検討した。

【対象と方法】北海道大学病院神経内科、帯広厚生病院神経内科、釧路労災病院神経内科で神経内科専門医によって診断された多系統萎縮症患者、パーキンソン病患者および健常対照者より血漿を採取し、血漿中の microRNA 発現の比較を行った。まず、1 色法マイクロアレイ解析によって 1,720 種の microRNA の発現量を網羅的に測定し、多系統萎縮症で発現が上昇している microRNA、低下している microRNA を検索した。さらに、多系統萎縮症群(MSA-C 群および MSA-P 群)、パーキンソン病群を対象に、SYBR グリーン法を用いた逆転写リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)を施行することによって、マイクロアレイ法で同定された microRNA 発現量を定量し、群間比較をおこなった。発現量変化が認められた

microRNA の予測標的遺伝子を、microRNA の標的予測ツールである miRmap を用いて 50 種ずつ抽出し、抽出された標的遺伝子の enrichment 解析を施行することによって、同定された microRNA に関与する Gene Ontology プロセスの検索を行った。

【結果】マイクロアレイ解析では多系統萎縮症で有意に発現上昇している 4 種の microRNA と、有意に発現低下している 75 種の microRNA を同定した。マイクロアレイ解析で同定された microRNA から 11 種の microRNA を選択し、RT-qPCR 法による解析を行った。RT-qPCR では、hsa-miR-671-5p の発現量が MSA-P 群、パーキンソン病群において健常対照群、MSA-C 群に対して有意に低下していた。また、hsa-miR-19b-3p の発現量はパーキンソン病群において健常対照群、MSA-C 群、MSA-P 群より有意に上昇し、hsa-miR-24-3p の発現量はパーキンソン病群において MSA-C 群より有意に上昇していた。さらに hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量には強い相関が確認された。一方で、これらの microRNA の発現量と各疾患の罹病期間や重症度との相関は認められなかった。各 microRNA の予測標的遺伝子の検索を行い、enrichment 解析でこれらの予測標的遺伝子と関連するプロセスを検索したところ、hsa-miR-671-5p が筋収縮や神経分化のプロセスと関与している可能性が示唆された。また、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p が神経伝達物質の再取り込みやシナプス伝達に関与している可能性が示された。

【考察】miRmap および enrichment 解析による *in silico* 解析では hsa-miR-671-5p が筋収縮や神経分化などのプロセスに関連している可能性が示され、hsa-miR-671-5p 発現量がパーキンソン病や MSA-P における症状を反映している可能性や発症機序に関与している可能性が示唆された。hsa-miR-671-5p は中枢神経に広範に分布する CDR1 遺伝子の発現を抑制することが報告されており、今後 CDR1 遺伝子と多系統萎縮症、パーキンソン病の関連を解析する必要があると考える。また、hsa-miR-671-5p は MSA-C 群と MSA-P 群の間で発現が異なることが示されたが、これまで MSA-C と MSA-P で発現の異なる microRNA の報告はない。MSA-C と MSA-P は多系統萎縮症のサブグループであるが、地域によって多い病型が異なり、また、病理学的検討における神経変性の分布や脳 MRI 所見が異なるなど相違点も多い。hsa-miR-671-5p は、これらの相違点を反映している可能性があり、hsa-miR-671-5p の生体内での機能を解析することや、MSA-C と MSA-P で発現が異なる microRNA の更なる検索を行うことが重要と考えられる。hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p は、他検体を用いた既報でも多系統萎縮症やパーキンソン病で発現量が変化することが報告されており、これらの疾患との関連が深いと思われた。enrichment 解析では hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子が、神経におけるドパミン再取り込みやシナプス伝達と関連している可能性が示唆され、特にパーキンソン病との関連が強いことが推察された。hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の発現量は強く相関しており、これらの microRNA が同一の遺伝子の発現制御や同一プロセスに関与することによって、パーキンソン病の発症に関与している可能性が推察される。本研究で同定された microRNA は単独では診断バイオマーカーとして十分な感度・特異度を得ることができなかった。今後、他のバイオマーカーとの組み合わせによる検討やバイオマーカー候補になる microRNA の更なる検索が必要と考える。

【結論】本研究では、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の発現量が、多系統萎縮症群（MSA-C 群、MSA-P 群）、パーキンソン病群で異なることが示され、診断バイオマーカーの候補になる可能性や、各疾患の病態の違いをしている可能性が示唆された。今後、これらの microRNA の機能やこれらの発現量変化が生体に及ぼす影響などの解析が望まれる。また、多系統萎縮症やパーキンソン病の診断バイオマーカーは十分に確立しておらず、病態機序の解明も不十分である。多系統萎縮症とパーキンソン病の発症には多数の因子が複合的に関与していることが考慮されるため、多系統萎縮症やパーキンソン病における microRNA 発現量解析を継続的に行うことや、他検体、他疾患での microRNA 発現量変化を行い、バイオマーカーの候補となる microRNA の検索を行うことが重要と考える。