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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14043
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78273
Type	doctoral thesis
File Information	Hisashi_Uwatoko.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

上 床　　尚

学　位　論　文

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

上 床　　尚

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・　1頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　21頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　47頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　49頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　50頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　51頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Hisashi Uwatoko, Yuka Hama, Ikuko T. Iwata, Shinichi Shirai, Masaaki Matsushima, Ichiro Yabe, Jun Utsumi, Hidenao Sasaki

Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease.
Molecular Brain, 12 (1): 49 (2019)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Hisashi Uwatoko, Yuka Hama, Ikuko Takahashi, Masaaki Matsushima, Takahiro Kano, Ichiro Yabe, Hidenao Sasaki

   Search for plasma microRNAs as diagnostic biomarkers of multiple system atrophy.
   The 23rd World Congress of Neurology, 京都, 2017年9月

2. Hisashi Uwatoko, Yuka Hama, Shinichi Shirai, Ikuko Takahashi, Masaaki Matsushima, Ichiro Yabe, Hideki Houzen, Kazufumi Tsuzaka, Hidenao Sasaki

   Expression change of plasma microRNAs in multiple system atrophy and Parkinson's disease.
   The 71st AAN Annual Meeting, Philadelphia, 2019年5月

要　旨

【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とし、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速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 の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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

MRI	magnetic resonance imaging
MSA	multiple system atrophy
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SARA	the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia
UMSARS	the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale
UPDRS	the Unified Parkinson's disease Rating Scale

緒言

1) 多系統萎縮症

多系統萎縮症(multiple system atrophy: MSA)は孤発性脊髄小脳変性症に分類される難治性神経変性疾患であり、主に 40 歳代以降の成人期に発症する進行性の自律神経障害、小脳性運動失調症、パーキンソニズムが三大症候である(Fanciulli and Wenning, 2015)。

元々は小脳性運動失調症を呈するオリーブ橋小脳萎縮症(olivopontocerebellar atrophy: OPCA)、パーキンソニズムを呈する線条体黒質変性症 (striatonigral degeneration: SND)、および、自律神経障害が中核症状である Shy-Drager 症候群が別々の疾患として報告されていたが、進行するとそれぞれの症状が組み合わさって出現することや類似した病理所見が認められることより、これらを包括して多系統萎縮症の疾患概念が提唱された(Graham and Oppenheimer, 1969)。

多系統萎縮症では自律神経障害症状として起立性低血圧、陰萎、排尿障害、排便障害など、小脳性運動失調症として失調様歩行、歩行障害、構音障害、四肢運動失調などが認められる。また、パーキンソニズムとして動作緩慢、筋強剛、振戦などが認められるが、パーキンソン病患者と比べてレボドパによる治療効果が乏しいことが特徴的である(Fanciulli and Wenning, 2015)。

現在、多系統萎縮症の診断には“The second consensus statement on the diagnosis of MSA”(Gilman et al., 2008)が用いられ、小脳性運動失調症が前景に立つ症例を multiple system atrophy with predominant cerebellar ataxia(MSA-C)、パーキンソニズムが前景に立つ症例を multiple system atrophy with predominant parkinsonism(MSA-P)の 2 病型に分類している(Gilman et al., 2008)。

MSA-C は日本で多い病型であり、日本の多系統萎縮症症例のおよそ 60 - 80%を占めるが(Sakushima et al., 2015; Watanabe et al., 2002; Yabe et al., 2006)、アメリカ、ヨーロッパ諸国、韓国などからの報告では多系統萎縮症症例のおよそ 60-70%を MSA-P が占める。(Kim et al., 2011; Kollensperger et al., 2010; Low et al., 2015)。

自律神経症状による起立・座位不耐、小脳性運動失調症やパーキンソニズムによる歩行障害、嚥下障害などの症状は進行性に悪化し、嚥下障害、声門開大不全などの症状も出現する。発症から中央値 5 年で移動に車いすを要するようになり、6 - 8 年で寝たきり状態に至り、中央値 10 - 14 年で死亡する予後不良な神経変性疾患である(Ben-Shlomo et al., 1997;

Sakushima et al., 2015; Watanabe et al., 2002)。また、MSA の死因としては、誤嚥性肺炎や尿路感染症といった感染症や声門開大不全などに由来する突然死が多い(Papapetropoulos et al., 2007; Zhang et al., 2018a)。

病理学的には、MSA はオリゴデンドロサイトで認められるα-synuclein 陽性のグリア細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCI)に特徴付けられ(Papp et al., 1989; Trojanowski et al., 2007)、その他、α-synuclein 陽性封入体が神経細胞やグリア細胞の細胞質内、核内などに認められる。また、基底核、小脳、脳幹部の脳萎縮、神経細胞脱落、グリオーシスが認められる。

病理所見における脳萎縮、神経細胞脱落やグリオーシスは臨床所見を反映し、MSA-C では小脳、橋を中心とした脳萎縮および橋核、下オリーブ核、小脳皮質の神経細胞脱落やグリオーシスが目立ち、一方で、MSA-P では被殻の萎縮および被殻背外側、黒質の神経細胞脱落やグリオーシスが優位となる(Lantos, 1998)。

神経変性の程度や分布は罹病期間や病型とも相関することが報告されており(Wenning et al., 1994)、パーキンソニズムは線条体における神経変性と相関し、小脳性運動失調症は小脳における Purkinje 細胞の減少や下オリーブ核・橋下部での神経細胞脱落と相関するとされている。(Wenning et al., 1997)

各種脳画像検査でも病型に応じて病理所見を反映した画像所見が得られる。脳 MRI では、MSA-C では小脳、橋の萎縮や橋横走線維の変性を反映した橋底部の十字状の T2 強調画像高信号域 “hot cross bun sign”**(図 1a)**が認められる(Savoiardo et al., 1990)。一方、MSA-P では、被殻の萎縮や被殻背外側の線状 T2 強調画像高信号域“hyperintense putaminal rim”**(図 1b)**が認められる(Kraft et al., 1999; Schulz et al., 1994)。これらは病初期には認められない場合も多いが、症状の進行に伴って、MRI での所見が明瞭となる場合が多い。また、MSA-C では、^{123}I-IMP などを用いた脳血流シンチグラフィで、小脳血流および脳幹の脳血流低下が認められ、診断の補助として用いられる。

しかし、hot cross bun sign や脳血流シンチグラフィでの小脳血流低下は、遺伝性脊髄小脳変性症でも認められる場合があり、疾患特異性は高くなく、画像診断を行うにあたって注意を要する。

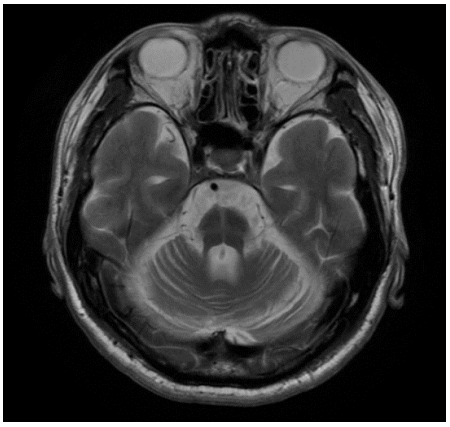
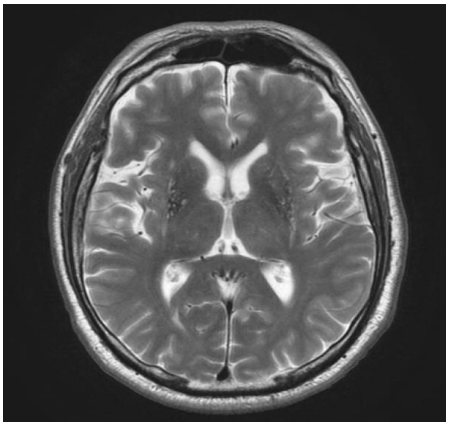
a)  b) 

図 1 多系統萎縮症の MRI

a) MSA-C 患者の脳 MRI, b) MSA-P 患者の脳 MRI

MSA-C 患者の脳 MRI では小脳・脳幹の萎縮および hot cross bun sign が、MSA-P 患者の MRI では被殻の萎縮および hyperintense putaminal rim が認められる。

実臨床においては、MSA の診断には前記 consensus statement(Gilman et al., 2008)を用い、症状、画像所見、病理所見などに基づいて definite MSA、probable MSA および possible MSA と診断する。

Definite MSA は、病理解剖で、α-synuclein 陽性グリア細胞質内封入体を中枢神経広汎に認めること、および、黒質線条体系もしくはオリーブ橋小脳系の神経変性が確認されることによって診断される。

Probable MSA は、成人発症で孤発性であること、進行性の経過であること、自律神経障害に加えて小脳性運動失調症もしくはレボドパによる治療効果が乏しいパーキンソニズムが認められることによって診断される。Probable MSA の診断基準では自律神経障害として、尿失禁もしくは立位 3 分以内に収縮期血圧 30 mmHg 以上ないし拡張期血圧 15 mmHg 以上の低下を伴う起立性低血圧の証明が必要である。

Possible MSA は成人発症で孤発性であること、進行性の経過であること、パーキンソニズムもしくは小脳性運動失調症を認めること、自律神経障害(他疾患で説明のつかない頻尿、尿意切迫、陰萎、MSA-P の基準を満たさない起立性低血圧)を認めることに加え、多系統萎縮症を示唆する附帯所見(錐体路徴候、喘鳴、脳 MRI での被殻、中小脳脚、橋、小脳の萎縮など) があることによって診断される。

しかし、病初期には臨床症状が軽微であることや MRI などの画像所見で

の異常が軽微もしくは確認されないことが多い。そのため、多系統萎縮症の診断は、症状が進行してから確定する場合も多く、早期診断に難渋することが多い。

また、病理解剖症例を用いて consensus statement の有用性を評価した研究では、初回診察時の possible MSA の診断基準の感度は 41%、probable MSA の診断基準の感度は 18%と診断感度は充分ではないことが報告されている(Osaki et al., 2009)。最終診察時には possible MSA の診断基準で感度 92%、probable MSA の診断基準で感度 63%と経時的に診断感度が上昇することも報告されているが、consensus statement をもってしても発症早期の多系統萎縮症の正確な診断が難しいことが示されている。

多系統萎縮症患者の多くは孤発性に発症するが、極めて稀に家族性に発症する。家族性 MSA および孤発性 MSA 患者の一部に *COQ2* 遺伝子変異を認められること(Multiple-System Atrophy Research, 2013)、MSA 患者における(src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (*SHC2*)遺伝子のコピー数多型現象が認められること(Sasaki et al., 2011)が報告されており、さらに、genome-wide association study (GWAS)の結果、*FBXO47* 遺伝子、*ELOVL7* 遺伝子、*EDN1* 遺伝子,*MAPT* 遺伝子など複数の遺伝子は疾患関連遺伝子として同定されている(Sailer et al., 2016)。疾患関連遺伝子が複数同定されてきていること、地域によって MSA-C と MSA-P の割合が大きく異なることなどは、多系統萎縮症の発症には、環境因子、遺伝的因子、エピジェネティック因子が関与することを示唆する所見である。

上記のように、多系統萎縮症は多因子疾患と考えられており、環境因子、遺伝的因子、エピジェネティック因子が複合的に関与していると考えられているが、その発症機序はいまだ十分解明されていない。そのため、多系統萎縮症の発症に関与する因子の更なる検索を進めていくことが極めて重要である。

2) パーキンソン病

パーキンソン病は、1817 年に James Parkinson による著書 “An Essay on Shaking Palsy”で初めて報告された疾患であり、後に Jean Martin Charcot によってパーキンソン病と名付けられた。パーキンソン病は、世界的にアルツハイマー型認知症についで２番目に多い神経変性疾患であり、安静時振戦、筋強剛、動作緩慢、姿勢反射障害などの様々な運動症状がよく知られるところであるが、嗅覚障害、自律神経症状、認知症、精神症状、睡眠障害などの多彩な非運動症状を呈することも知られてきている(Kalia and Lang, 2015)。

パーキンソン病は、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が一つの特徴とされ、ドパミン産生ニューロン脱落とパーキンソニズムの重症度に相関があることが示されている(Dickson et al., 2009)。また、α-synuclein が神経細胞に沈着して形成される Lewy 小体もパーキンソン病の重要な特徴とされる(Goedert et al., 2013)。Lewy 小体が末梢神経や迷走神経から脳幹、基底核、大脳皮質へと伝播する Braak 仮説が提唱されており、パーキンソン病発症機序の研究が進んでいるが、Braak 仮説のみではパーキンソン病の進行を説明できない症例も多い。また，α-synuclein の蓄積や Lewy 小体が神経細胞脱落に及ぼす影響やα-synuclein が神経細胞内に蓄積する機序なども充分には解明されておらず、いまだ発症機序が病態については未解明な部分が多い。

パーキンソン病に対してはレボドパ製剤の開発以降、ドパミンアゴニスト製剤、アマンタジン、カテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)阻害薬、モノアミン酸化酵素 B(MAO-B)阻害薬、ゾニサミド、抗コリン薬、アデノシン A_{2A} 受容体阻害薬など多くの治療薬が開発され、実臨床で使用されている(Kalia and Lang, 2015)。また、薬物療法のみならず、深部脳刺激療法(Schuepbach et al., 2013)も実臨床で応用されるようになり、パーキンソン病の治療選択肢は年々広がっている。

パーキンソン病は進行性の変性疾患であり、進行期には動作緩慢、嚥下障害、認知機能障害などが目立つようになり寝たきり状態に至る可能性もあるが、多系統萎縮症などパーキンソニズムを呈する他の神経変性疾患と比較すると、その進行は一般に緩徐である。そのため、他の変性疾患との鑑別を早期に行い、適切な治療介入を行うことによって長期間にわたって日常動作の維持が図ることがパーキンソン病診療で重要となる。

パーキンソン病の診断は病歴、神経症状、レボドパ製剤の治療効果などに基づいて行われる。また、^{123}I-*meta*-iodobenzylguanidine (MIBG)心筋

シンチグラフィでの集積低下(Braune et al., 1998; Orimo et al., 2005)や ^{123}I-Ioflupane を用いた dopamine transporter single-photon emission computed tomography (DaT-SPECT)での基底核への集積低下(Catafau et al., 2004)の検出なども診断の補助として活用されるが、パーキンソン病においても DaT-SPECT での集積低下を認めない SWEDDs (scan without evidence of dopaminergic deficits) の概念も提唱されており、画像検査のみでの正確な診断は難しい。

パーキンソン病の診断においては、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、本態性振戦、脳血管性パーキンソン症候群、薬剤性パーキンソン症候群など類似した症状を呈する疾患の鑑別も極めて重要である。しかし、これらの鑑別疾患においてもレボドパによる治療効果を一部認める場合や核医学検査で類似の所見を呈する場合があり、正確な鑑別診断が難しい症例も多い (Adler et al., 2014)。

パーキンソン病の診断基準としては、"The Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease"が用いられる(Postuma et al., 2015)。この診断基準はパーキンソニズムを有する患者に対して使用され、パーキンソン病を支持する支持的基準、他疾患の可能性を示唆する 2 種類の除外基準(絶対的除外基準および相対的除外基準)によって構成される。支持的基準にはドパミン補充療法の有効性、レボドパ誘発性のジスキネジア、安静時振戦、嗅覚低下、^{123}I- MIBG 心筋シンチグラフィの集積低下が含まれる。一方、除外基準には小脳性運動失調症、核上性眼球運動障害、高度の自律神経障害、呼吸障害、ドパミン遮断薬使用歴など、他病態を示唆する項目が含まれている。同診断基準は、パーキンソニズムを呈する患者における支持的基準、絶対的除外基準、相対的除外基準を組み合わせによって、特異度が 90%以上となる clinically established Parkinson's disease の診断基準と、感度、特異度がそれぞれ 80%以上となる clinically probable Parkinson's disease の診断基準から構成される。しかし、発症早期においては、この診断基準を用いてもパーキンソン病と他のパーキンソン症候群の鑑別が難しい場合も多い。

3)パーキンソン病と多系統萎縮症の鑑別

特に多系統萎縮症とパーキンソン病は、ともにα-synuclein 蓄積が病理学的特徴とされるα-synucleinopathy に分類される疾患であるが、いずれも発症機序が十分には解明されていない。

多系統萎縮症とパーキンソン病は、一般的には孤発性・進行性の神経変性疾患であり、パーキンソニズムや自律神経障害を呈すること、進行期に寝たきり状態となり嚥下障害や感染症などが大きな問題となることなど類似する点が多い。

一方で、パーキンソン病の進行は多系統萎縮症と比較すると緩徐であり、また、レボドパ製剤などの抗パーキンソン病薬や深部脳刺激療法での症状緩和が望める疾患である。そのため、パーキンソン病と多系統萎縮症では治療方針、神経症状の長期的な予後、生命予後が大きく異なる。

したがって、これらの疾患の診療においては、臨床経過、診察所見、MRI や核医学検査といった画像検査、レボドパ治療の有効性などを考慮しながら、各疾患のガイドラインを用いて早期鑑別、早期治療を行い、長期予後を推察しながら治療方針を決定したり、療養体制を構築したりことが極めて重要である。

しかし、パーキンソン病と多系統萎縮症は、病初期において、診察所見、画像所見、治療反応性などが非常に似通う場合もあり、両者の鑑別は必ずしも容易ではない。そのため多くの施設で、多系統萎縮症およびパーキンソン病の早期診断や早期鑑別に有用なバイオマーカーの検索が行われているが、これまで早期診断・早期鑑別に有用なバイオマーカーは確立していない。

3) microRNA

microRNA は 18-25 nt の低分子 1 本鎖 RNA であり、Ambro らによって存在が報告された。Ambro らは線虫幼虫の発達過程を対照する *lin-4* 遺伝子の研究において、同遺伝子がタンパク質へ翻訳されない 22 nt の non-coding RNA (ncRNA)をコードしていることを発見し、さらに *lin-14* 遺伝子の 3'非翻訳領域に *lin-4* RNA 配列と相補的な配列が複数含まれことを報告した(Lee et al., 1993)。その後、*lin-4* RNA によって LIN-14 タンパク質の発現が抑制されること、LIN-14 タンパク質発現抑制には *lin-14* messenger RNA の発現量低下が伴わないことが報告され、*lin-4* RNA が *lin-14* 遺伝子の転写後の発現調整に関与していることが示された(Wightman et al., 1991; Wightman et al., 1993)。ヒトにおいても同様の機能を持つ ncRNA が発見され、2001 年にこれらの RNA が microRNA と命名された(Lagos-Quintana et al., 2001)。

多くの microRNA 遺伝子はイントロン領域に分布し、単独もしくはクラスターを形成して存在する。microRNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol II)によって、ヘアピン構造を持つ primary microRNA (pri-microRNA)へと転写される。Pri-microRNA が DiGeorge critical region 8 (DGCR8) dimer と、RNase III の Drosha によって構成される microprocessor によって切断されることによって、precursor microRNA (pre-microRNA)が産生され、Exportin 5 によって核外へ輸送される。pre-microRNA が、別の RNase III である Dicer によって切断されることによって二本鎖 RNA (microRNA duplex)が形成され、一方の RNA (microRNA)が Argonaute (AGO)タンパク質に取り込まれる。microRNA を取り込んだ AGO タンパク質は、Dicer および trans-activation-responsive RNA-binding protein (TRBP)と複合体を形成し、RNA-induced silencing complex (RISC)を構成する。RISC は microRNA の標的となる mRNA 3'非翻訳領域の相補的な配列に結合し、messenger RNA の分解促進や翻訳阻害を引き起こす(Treiber et al., 2018)。**(図 2)**

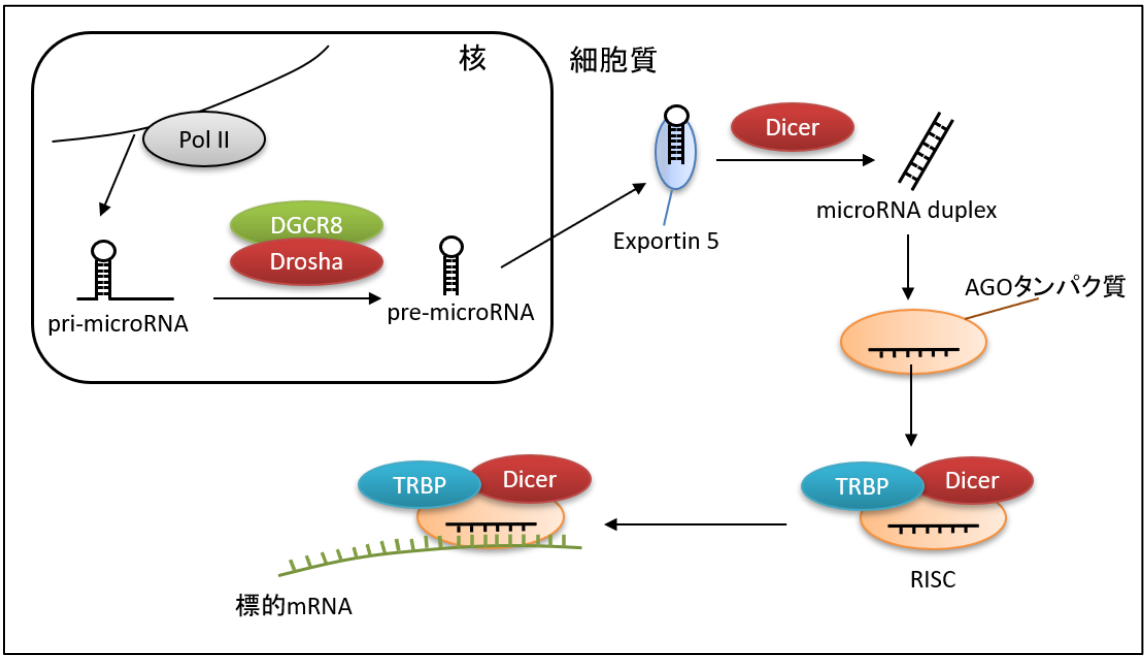


図 2. microRNA のよる RISC 形成、標的 messenger RNA 結合の模式図

microRNA は、転写後の遺伝子発現抑制によって細胞増殖、分化などを制御する重要な役割を果たすと考えられ(Bartel, 2004)、microRNA の発現や機能の障害が、固形癌、血液悪性腫瘍、感染症、冠動脈疾患など種々の疾患の病態に関与することが示唆されている(Rupaimoole and Slack, 2017)。

また、悪性腫瘍、ウイルス感染症、糖尿病、代謝性疾患、冠動脈疾患、精神疾患などを含む多彩な疾患において、特定の microRNA 発現量が変化することが報告されており、これらの microRNA が診断バイオマーカーおよび病態を反映したバイオマーカーになる可能性が報告されている。(Issler and Chen, 2015; Wang et al., 2016)。

近年、アルツハイマー型認知症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、多系統萎縮症、多発性硬化症、てんかんなどの神経疾患においても、血清、血漿、髄液、組織中の microRNA 発現が変化することが報告され、疾患バイオマーカーとしての有用性が期待されていている(da Silva et al., 2016; Takahashi et al., 2015; Van Giau and An, 2016; Vistbakka et al., 2017)。一方で、パーキンソン病と多系統萎縮症における microRNA 発現量の比較や多系統萎縮症のサブタイプ (MSA-P、MSA-C) 間の microRNA 発現の比較をした報告は少ない。

本研究では、microRNA が様々な疾患で病態に関与している可能性がある点や、診断バイオマーカーとしての有用性が示されてきている点に着目した。

そこで、多系統萎縮症とパーキンソン病患者を対象に、血漿中の microRNA 発現量をマイクロアレイ解析および逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR)で測定し、多系統萎縮症、パーキンソン病の病態を反映した microRNA や診断バイオマーカー候補となりうる microRNA の検索を行った。

方法

1. 対象

本研究は北海道大学病院神経内科、帯広厚生病院神経内科および釧路労災病院神経内科で神経内科専門医により診断された MSA-C 患者、MSA-P 患者およびパーキンソン病患者を対象に施行した。MSA-C および MSA-P は、”The second consensus statement on the diagnosis of MSA” (Gilman et al., 2008)で probable MSA の診断基準を満たす症例を対象とし、診断時にパーキンソニズムが優位であった症例を MSA-P 群、小脳性運動失調症が優位であった症例を MSA-C 群とした。また、年齢・性別に有意差が生じないよう調整した 50 – 75 歳の健常ボランティアを健常対照群とした。

悪性腫瘍、精神疾患、膠原病、内分泌疾患、感染症は microRNA 発現量を変化させることが報告されているため、これらの既往症、併存症がある対象者は健常対照群より除外した。

患者背景として、性別、発症年齢、併存症、血液採取時の年齢、罹病期間、臨床評価スケールを診療記録より抽出した。臨床評価スケールは、多系統萎縮症症例では the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS) (Wenning et al., 2004)、the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (Schmitz-Hubsch et al., 2006)、Barthel Index (Mahoney and Barthel, 1965)を用いて症状および重症度の評価を行った。UMSARS は広く使用されている多系統萎縮症の症状評価スケールであり、Part 1 で病歴聴取による日常動作の評価、Part 2 で診察によるパーキンソニズムおよび小脳性運動失調症の評価、Part 3 で自律神経障害の評価、Part 4 で全体の障害度評価が行い、それぞれの点数から重症度を評価する。また、SARA は小脳性運動失調症を診察に基づいて点数化するスケールである。いずれも多系統萎縮症の重症度評価に有用なスケールであり(Matsushima et al., 2016)、日常診療で使用される。また、パーキンソン病症例で the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS) (Fahn S, 1987)を用い、症状および重症度の評価を行った。UPDRS は問診、診察所見よりパーキンソン病の重症度を評価するスケールであり、Part 1 で精神機能、行動および気分、Part 2 で日常動作の問診、Part 3 で診察によるパーキンソニズムの評価、Part 4 で治療に伴う合併症を評価する。全てで 42 の評価項目があり、それぞれ 0 – 4 の 5 段階で評価し、重症度を数値化する。

本研究に際し、我々は北海道大学倫理委員会に対して倫理審査を受け承認を受けた。(北海道大学大学院医学研究科　医 13-0335「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」、北海

道大学大学院医学研究科　医 14-004「多系統萎縮症の発症素因に関する遺伝子解析および分子バイオマーカーに関する研究」、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」、北海道大学病院　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」、北海道大学病院　自 010-0199「比較対照群としての神経疾患在非保有者血漿、血清、尿試料バンク」、北海道大学病院　自 015-0268　「小脳失調における時間認知課題の多施設前向き観察研究」）

2. 検体選択および検体採取

血清内の microRNA 発現量を検討した既報が多いが、凝固過程が microRNA 発現量に影響を及ぼす可能性が報告されている(Wang et al., 2012)。本研究では、血液凝固による microRNA 発現量への影響を避けるため、血漿中の microRNA 発現量の比較検討をした。

血液検体採取はエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液(disodium ethylenediaminotetraacetic acid; Na_2EDTA)入り採血管を用いて行った。採取した血液は 4 ℃ 、3,000 x *g* の遠心分離を 30 分施行し、上清を血漿として取り出し、RNA 抽出までは-80 ℃ で保存した。また、溶血や乳びによる microRNA 発現変化(Max et al., 2018) や他病態による microRNA 発現変化を避けるため、溶血、乳びがある血液や一般血液検査データに異常値を認めた血液は解析対象から除外した。

MSA-C 患者、MSA-P 患者においては、多系統発症後早期の microRNA 発現量変化を解析するため、probable MSA の診断基準を満たした時点、もしくはそれ以前に採取・保存された凍結血漿を用いて、microRNA 解析を施行した。

3. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、MSA 症例 11 例 (MSA-C 8 例、MSA-P 3 例)および 6 例の健常者を対象として施行した。

300 μL の保存血漿から 3D-Gene® RNA extraction reagent (TORAY Industries, Inc., Tokyo, Japan)を用いて、トータル RNA を抽出し、Exiqon miRCURY LNA™ microRNA Array Power Labeling kit (Exiqon Inc.,Woburn、MA、USA) を用いて標識した。1,720 種の microRNA の検出用オリゴ DNA プローブが搭載された 3D-Gene® Human microRNA oligo chip (Ver.17.0) (TORAY Industries、Inc., Tokyo, Japan)を用いて、microRNA の一色法マイクロア

レイ測定を施行した。マイクロアレイ法で得たシグナルからバックグランドノイズの補正を行い、シグナル強度の中央値が 25 となるように global normalization を施行し、統計解析を施行した。

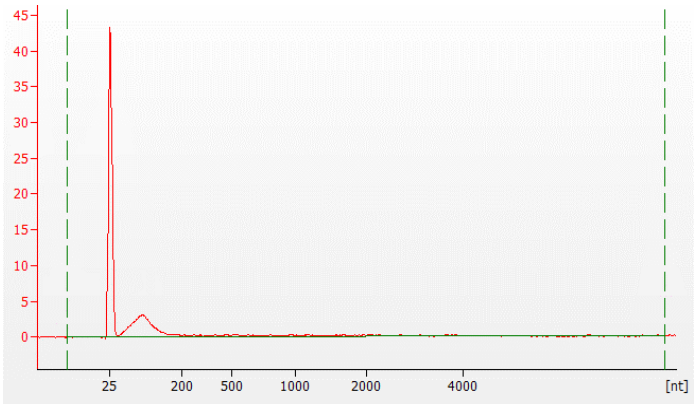
4. 逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)

miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA)を用いて、200 μL の凍結血漿より total RNA を精製した。凍結保存血漿を氷上で融解し、細胞成分（buffy coat など）の混入を避ける為、使用前に 4 ℃ 、3,000 x *g* で 15 分間の遠心分離を施行し、上清を使用した。血漿 200 μl にチオシアン酸グアニジン、フェノール含有溶液 1,000 μl を加えたのち、spike-in control として、*Caenorhabditis elegans* miR-39-3p (Cel-miR-39-3p) 合成ヌクレオチド RNA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)を 400 atto mol 追加した。次にクロロホルム 200 μl を追加し、4 ℃ 、12,000 x *g* 、15 分の遠心分離を行い、total RNA 含有相を抽出し、シリカメンブレンを用いて total RNA の精製を行った。

抽出した精製 total RNA は、Bioanalyzer 2100® および Agilent RNA 6000 pico kit (Agilent Technology Inc. Urdorf, Switzerland)を用いて，濃度測定、品質確認を行った(**図 3a**)。Agilent RNA 6000 pico kit による泳動結果で不整形ピークやコンタミネーションを示唆するピーク(**図 3b**)を認めた検体は解析から除外し、血漿から RNA 再抽出の上、再度品質確認を行った。RNA 再抽出後も不整形ピークやコンタミネーションが認められた検体は対象から除外した。

Agilent RNA 6000 pico kit による濃度測定結果に基づき total RNA が 1 ng/20 μl となるよう調整し、miScript II RT kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA)を用いて相補的 DNA (complementary DNA; cDNA)へ逆転写を行った。

a)



b)

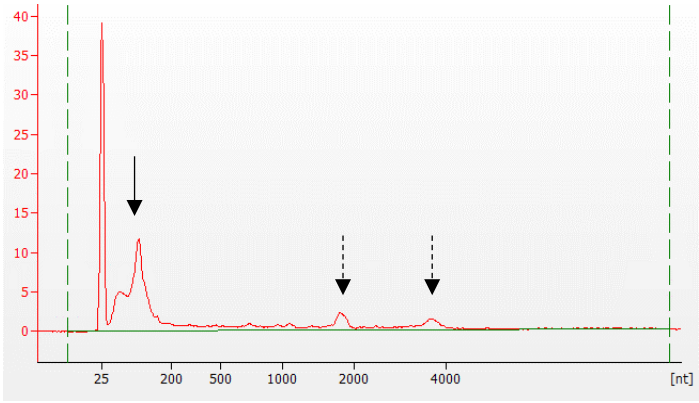


図 3　Agilent RNA 6000 pico kit による泳動結果

a) microRNA のピークのみを認める。

b) 不整形ピーク(実線)、2000nt、4000nt の(点線)コンタミネーションのピークを認める。

逆転写で得た cDNA を 5 倍希釈し、miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA)と、それぞれの対象 microRNA に対応する miScript primer Assays (QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA)を使用して、リアルタイム PCR 施行し、対象 microRNA の定量測定を行った。リアルタイム PCR には Applied Biosystem® StepOnePlus™ real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用した。マイクロアレイ解析結果より hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-920、hsa-miR-3622b-5p、hsa-miR-4708-3p、hsa-miR-4722-5p および hsa-miR-4736 を RT-qPCR による定量解析対象とした。

各検体は 1 種の microRNA 毎に 2 回ずつ qPCR を施行し、再現性の乏しい

ものは qPCR 再施行した。qPCR 再施行後でも再現性が乏しい場合には、RNA 再抽出もしくは解析対象から除外した。マイクロアレイ解析結果より hsa-miR-4516 を internal control 選択し、各 microRNA の threshold cycle (CT) と internal control の CT を比較するΔΔCT 法を用いて、microRNA 発現量の定量を行った。

5. Enrichment 解析による各 microRNA に関連する Gene Ontology プロセスの検索

microRNA の標的予測ツールである miRmap (https://mirmap.ezlab.org) (Vejnar and Zdobnov, 2012)を使用し、マイクロアレイ法および RT-qPCR で同定された各 microRNA の予測標的遺伝子を検索した。標的遺伝子 messenger RNA と microRNA の相補性および結合の熱力学的解析、標的遺伝子の配列保存性、AU 含有量などから算出される miRmap score が高い順に 50 種抽出し、予測標的遺伝子とした。次に MetaCore™ from Clarivate Analytics (Philadelphia, PA, USA)を使用し、Gene Ontology term を用いた enrichment 解析を行い、各 microRNA の予測標的候補遺伝子に関連する Gene Ontology プロセスの検索を行い、統計学的有意差に基づき上位 15 プロセスを抽出した。

6. 統計処理

統計解析は JMP® Version 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1987-2007)を用いておこなった。microRNA 発現量の群間比較には Kruskal-Wallis 検定および Welch の t 検定、患者背景データの群間比較には Welch の t 検定、microRNA 発現量と患者背景データの相関解析は Spearman の順位相関係数を用い、$p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結果

1. マイクロアレイ法による発現量変化のある microRNA のスクリーニング

1) 患者背景

多系統萎縮症群の平均年齢は 62.6 歳、平均罹病期間は 2.7 年、健常対照群の平均年齢は 60.7 歳であり、両群の年齢・性別の分布には有意差は認められなかった**(表 1)**。多系統萎縮症群には MSA-C 症例および MSA-P 症例が含まれていたが、症例数が少ないため、多系統萎縮症(MSA-C + MSA-P)群と健常対照群間で施行した統計解析に基づき、多系統萎縮症で発現量が上昇あるいは低下している microRNA の検索を行った。

2) 発現変化のある microRNA の抽出 **(図 4)**

3D-Gene® Human miRNA oligo chip (Ver. 17.0) で測定可能な 1,720 種の microRNA のうち、279 種の microRNA が全ての検体で検出された。これらの 279 種の microRNA を対象として Welch の t 検定および Kruskal-Wallis 検定による統計解析を施行し、健常対照群と比べて MSA 群で発現量が有意に増加している microRNA (up-regulated microRNAs) を 4 種、有意に減少している microRNA (down-regulated microRNAs) を 75 種同定した。($p < 0.05$) **(表 2)**

RT-qPCR による解析対象とする down-regulated microRNAs をさらに絞りこむため、Welch の t 検定および Kruskal-Wallis 検定でより強い統計学的有意差 ($p < 0.01$)を示し、さらに、平均信号強度が 80 以上であった down-regulated microRNA 13 種を抽出した。**(表 3)**

3) RT-qPCR 解析の対象および internal control の選択

上記で抽出した microRNA のうち、4 種すべての up-regulated microRNA (hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-4708-3p、hsa-miR-4736、hsa-miR-663a)と発現量の群間差が大きかった 7 種の down-regulated microRNA (hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-3622b-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-920、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-4722-5p、hsa-miR-24-3p)を RT-qPCR による解析の対象とした。

また、internal control としては、マイクロアレイ解析で多系統萎縮症群、健常対照群で発現量が多く、発現量の群間差が少なく、各群内の分散も小さかった hsa-miR-4516 を選択した。ALS を対象として当教室で施行した microRNA 解析研究においても hsa-miR-4516 の発現は同様の傾向を示し、internal control として使用している(Takahashi et al., 2015)。

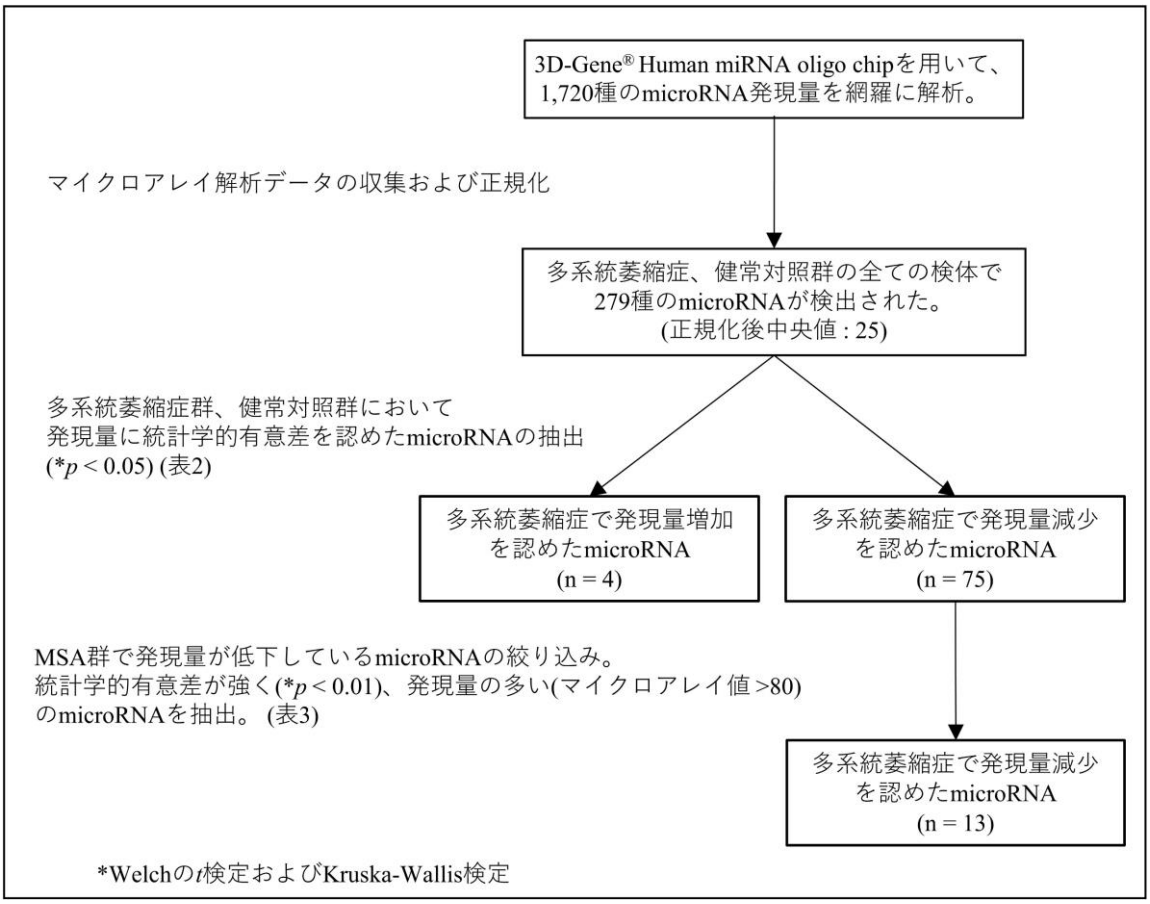


図 4　マイクロアレイ解析による 多系統萎縮症で発現量変化を認める microRNA 検索の流れ

表 1　マイクロアレイ解析対象の臨床的背景

	N	女性	男性	年齢	罹病期間 (年)	UMSARS Part 1	UMSARS Part 2	UMSARS Part 3 (ΔsBP)	UMSARS Part 3 (ΔdBP)	UMSARS Part 4
MSA	13	7 (53.8%)	6 (46.2%)	62.6 ± 2.0	2.7 ± 0.3	18.2 ± 1.5	16.5 ± 2.5	-28.2 ± 7.2	-9.6 ± 4.8	2.4 ± 0.4
健常対照	6	3 (50.0%)	3 (50.0%)	60.7 ± 0.8	-	-	-	-	-	-

(mean ± S.E.)

MSA、multiple system atrophy; UMSARS、Unified Multiple System Atrophy Rating Scale;
ΔsBP、起立時の収縮期血圧低下; ΔdBP、起立時の拡張期血圧低下; S.E.、標準誤差

表 2

マイクロアレイで同定された up-regulated および down-regulated microRNA

		Normalized Fluorescent Signal		発現量比	*p*-value	
		MSA	健常対照群	MSA / 健常	Welch's *t*-test	Kruskal-Wallis test
Up-regulated microRNAs	hsa-miR-4736	25.3 ± 1.9	15.5 ± 1.7	1.631	0.005	0.006
	hsa-miR-4708-3p	48.9 ± 11.5	18.8 ± 1.9	2.602	0.020	0.010
	hsa-miR-371b-5p	126.3 ± 33.8	25.6 ± 1.5	4.945	0.025	0.012
	hsa-miR-663a	1126.1 ± 107.0	775.2 ± 43.5	1.453	0.046	0.025
Down-regulated microRNAs	hsa-miR-4726-5p	116.4 ± 8.4	181.5 ± 7.0	0.641	<0.001	<0.001
	hsa-miR-4667-5p	89.9 ± 5.6	144.2 ± 5.6	0.623	<0.001	0.001
	hsa-miR-24-3p	482.3 ± 63.9	888.1 ± 44.1	0.543	0.003	0.002
	hsa-miR-370-3p	46.4 ± 4.1	73.5 ± 4.3	0.631	0.002	0.003
	hsa-miR-4728-5p	112.4 ± 11.7	189.3 ± 13.6	0.594	0.006	0.003
	hsa-miR-2392	38.0 ± 3.3	64.6 ± 4.5	0.589	0.002	0.003
	hsa-miR-4489	37.1 ± 3.2	60.0 ± 3.2	0.618	0.001	0.003
	hsa-miR-4722-5p	91.2 ± 10.9	172.3 ± 14.1	0.529	0.001	0.003
	hsa-miR-3150a-3p	36.8 ± 6.8	81.6 ± 8.8	0.451	0.003	0.004
	hsa-miR-658	74.2 ± 7.2	112.7 ± 4.1	0.658	0.007	0.004
	hsa-miR-1587	55.5 ± 6.6	86.6 ± 2.3	0.641	0.019	0.004
	hsa-miR-4270	132.6 ± 17.1	214.5 ± 9.2	0.618	0.021	0.006
	hsa-miR-3162-5p	155.7 ± 14.3	261.6 ± 29.0	0.595	0.003	0.006
	hsa-miR-4428	51.0 ± 5.8	89.6 ± 8.9	0.568	0.006	0.006
	hsa-miR-4800-5p	40.9 ± 2.2	59.6 ± 5.1	0.686	0.001	0.008
	hsa-miR-4776-5p	29.6 ± 3.0	50.8 ± 4.6	0.583	0.003	0.008
	hsa-miR-149-3p	573.6 ± 90.7	1025.1 ± 82.4	0.560	0.015	0.008
	hsa-miR-671-5p	172.2 ± 36.2	361.5 ± 63.5	0.476	0.012	0.008
	hsa-miR-920	135.4 ± 27.5	297.6 ± 26.8	0.455	0.004	0.008
	hsa-miR-3187-5p	63.2 ± 18.7	178.9 ± 19.3	0.353	0.003	0.008
	hsa-miR-3622b-5p	85.6 ± 26.4	249.4 ± 30.1	0.343	0.003	0.008
	hsa-miR-4648	21.2 ± 3.1	36.9 ± 3.9	0.577	0.015	0.010
	hsa-miR-25-3p	74.5 ± 8.2	152.2 ± 30.4	0.490	0.007	0.010
	hsa-miR-19b-3p	150.9 ± 24.7	431.4 ± 146.6	0.350	0.004	0.010
	hsa-miR-15b-5p	122.5 ± 25.6	449.4 ± 152.4	0.273	0.003	0.010
	hsa-miR-642b-3p	371.5 ± 38.3	525.9 ± 15.6	0.706	0.024	0.012
	hsa-miR-4743-5p	29.2 ± 2.2	42.1 ± 3.9	0.694	0.012	0.012
	hsa-miR-4721	37.4 ± 4.5	61.2 ± 5.5	0.610	0.012	0.012
	hsa-miR-4429	141.8 ± 10.3	233.8 ± 36.1	0.607	0.004	0.012
	hsa-miR-4539	37.8 ± 5.2	62.5 ± 4.0	0.605	0.017	0.012
	hsa-miR-3917	118.6 ± 13.9	199.3 ± 21.5	0.595	0.009	0.012
	hsa-miR-1224-5p	43.6 ± 5.7	75.0 ± 6.4	0.581	0.006	0.012
	hsa-miR-4259	106.2 ± 15.0	191.0 ± 23.9	0.556	0.013	0.012
	hsa-miR-125a-3p	25.7 ± 2.3	51.7 ± 9.5	0.496	0.003	0.012
	hsa-miR-4513	113.2 ± 28.9	264.9 ± 28.4	0.427	0.004	0.012
	hsa-miR-4664-5p	31.2 ± 4.0	73.4 ± 15.3	0.425	0.002	0.012
	hsa-miR-4751	55.0 ± 4.1	75.7 ± 6.2	0.726	0.021	0.016
	hsa-miR-3187-3p	30.1 ± 3.4	49.4 ± 5.1	0.609	0.010	0.016
	hsa-miR-320d	73.8 ± 11.0	165.5 ± 40.3	0.446	0.012	0.016
	hsa-miR-4738-3p	28.2 ± 1.8	36.2 ± 2.5	0.778	0.032	0.020
	hsa-miR-4697-5p	143.7 ± 16.4	205.0 ± 12.1	0.701	0.031	0.020
	hsa-miR-4689	551.6 ± 68.5	798.2 ± 16.2	0.691	0.043	0.020
	hsa-miR-4430	46.4 ± 5.4	69.9 ± 4.5	0.663	0.022	0.020
	hsa-miR-4750-5p	64.1 ± 8.8	96.8 ± 5.5	0.662	0.032	0.020
	hsa-miR-1913	50.6 ± 7.8	78.4 ± 4.5	0.645	0.042	0.020
	hsa-miR-4538	35.6 ± 4.0	55.3 ± 4.4	0.645	0.014	0.020
	hsa-miR-4440	30.8 ± 5.3	50.1 ± 1.9	0.614	0.026	0.020
	hsa-miR-3147	69.9 ± 12.0	130.5 ± 12.5	0.536	0.009	0.020
	hsa-miR-16-5p	231.4 ± 42.8	577.3 ± 152.5	0.401	0.011	0.020
	hsa-miR-23b-3p	347.3 ± 56.0	981.7 ± 283.1	0.354	0.005	0.020
	hsa-miR-4690-5p	67.4 ± 6.3	93.6 ± 4.0	0.721	0.017	0.025
	hsa-miR-4514	49.7 ± 4.9	75.5 ± 8.1	0.659	0.021	0.025

hsa-miR-3154	112.9 ± 20.8	207.4 ± 17.2	0.544	0.010	0.025
hsa-miR-21-5p	128.8 ± 27.7	443.0 ± 158.5	0.291	0.014	0.025
hsa-miR-3188	44.2 ± 4.2	57.6 ± 2.1	0.767	0.040	0.032
hsa-miR-4442	578.3 ± 61.5	837.9 ± 98.4	0.690	0.040	0.032
hsa-miR-3925-5p	68.0 ± 7.6	99.6 ± 8.5	0.683	0.046	0.032
hsa-miR-1307-3p	42.7 ± 5.4	67.3 ± 6.2	0.635	0.035	0.032
hsa-miR-92b-3p	143.6 ± 18.7	226.7 ± 31.8	0.633	0.020	0.032
hsa-miR-22-3p	401.2 ± 75.7	1006.3 ± 277.5	0.399	0.013	0.032
hsa-miR-99b-5p	17.1 ± 1.1	25.4 ± 3.3	0.672	0.012	0.039
hsa-miR-505-5p	26.7 ± 2.7	41.2 ± 5.5	0.649	0.021	0.039
hsa-miR-4447	109.9 ± 14.4	170.8 ± 23.0	0.643	0.035	0.039
hsa-miR-106b-5p	77.3 ± 11.4	181.3 ± 66.9	0.427	0.043	0.039
hsa-miR-23a-3p	456.7 ± 84.7	1112.1 ± 309.7	0.411	0.016	0.039
hsa-miR-425-5p	63.3 ± 10.1	159.9 ± 45.7	0.396	0.013	0.039
hsa-let-7f-5p	48.1 ± 9.0	198.9 ± 73.4	0.242	0.011	0.039
hsa-miR-3619-3p	273.5 ± 14.0	345.3 ± 28.8	0.792	0.035	0.049
hsa-miR-3622a-5p	62.8 ± 6.4	86.6 ± 6.2	0.725	0.039	0.049
hsa-miR-498-5p	28.7 ± 2.8	41.8 ± 4.7	0.686	0.029	0.049
hsa-miR-4496	61.3 ± 11.0	103.3 ± 10.4	0.594	0.030	0.049
hsa-miR-4723-5p	940.4 ± 187.3	1686.7 ± 374.4	0.558	0.034	0.049
hsa-miR-29a-3p	38.5 ± 4.8	76.4 ± 18.5	0.504	0.017	0.049
hsa-miR-4454	2844.0 ± 374.9	6868.7 ± 1994.4	0.414	0.012	0.049
hsa-miR-26a-5p	283.8 ± 58.7	946.9 ± 339.5	0.300	0.022	0.049

(mean ± S.E.)

表 3　マイクロアレイで抽出された RT-qPCR 解析対象候補 microRNA

		Normalized Value MSA群	Normalized Value 健常対照群	発現量比 MSA / 健常対照	*p*-value Kruskal-Wallis test
Up-regulated microRNAs	hsa-miR-371b-5p	126.3 ± 33.8	25.6 ± 1.5	4.945	0.012
	hsa-miR-4708-3p	48.9 ± 11.5	18.8 ± 1.9	2.602	0.010
	hsa-miR-4736	25.3 ± 1.9	15.5 ± 1.7	1.631	0.006
	hsa-miR-663a	1126.1 ± 107.0	775.2 ± 43.5	1.453	0.025
Down-regulated microRNAs	hsa-miR-15b-5p	122.5 ± 25.6	449.4 ± 152.4	0.273	0.010
	hsa-miR-3622b-5p	85.6 ± 26.4	249.4 ± 30.1	0.343	0.008
	hsa-miR-19b-3p	150.9 ± 24.3	431.4 ± 146.6	0.350	0.010
	hsa-miR-920	135.4 ± 27.5	297.6 ± 26.8	0.455	0.008
	hsa-miR-671-5p	172.2 ± 36.2	361.5 ± 63.5	0.476	0.008
	hsa-miR-4722-5p	91.2 ± 10.9	172.3 ± 14.1	0.529	0.003
	hsa-miR-24-3p	482.3 ± 63.9	888.1 ± 44.1	0.543	0.002
	hsa-miR-149-3p	573.6 ± 90.7	1025.1 ± 82.4	0.560	0.008
	hsa-miR-4728-5p	112.4 ± 11.7	189.3 ± 13.6	0.594	0.003
	hsa-miR-3162-5p	155.7 ± 14.3	261.6 ± 29.0	0.595	0.006
	hsa-miR-4270	132.6 ± 17.1	214.5 ± 9.2	0.618	0.006
	hsa-miR-4667-5p	89.9 ± 5.6	144.2 ± 5.6	0.623	0.001
	hsa-miR-4726-5p	116.4 ± 8.4	181.5 ± 7.0	0.641	<0.001

(mean ± S.E.)

2. RT-qPCR による microRNA 発現量の定量評価

1) 患者背景

RT-qPCR 法による解析では MSA-C 症例 31 例、MSA-P 症例 30 例、パーキンソン病症例 28 例、健常対照 28 例を対象として解析を行った。MSA-C 群、健常対照群は MSA-P 群、パーキンソン病群と比べてわずかであるが、有意に若かった。また、MSA-C 群、MSA-P 群の罹病期間は同様であったが、パーキンソン病群の罹病期間は MSA-C 群、MSA-P 群と比較して有意に長かった。**(表 4)**

UMSARS parts 1、part 2 および part 4 のスコアは MSA-C 群と比較して、MSA-P 群でわずかであるが有意に高く、Barthel Index はパーキンソン病群で MSA-C 群、MSA-P 群と比較して有意に高かった。

2) RT-qPCR での各 microRNA 発現量の定量

対象とした microRNA 11 種の qPCR は、同一のプロトコルで施行したが、5 種の microRNA (hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-4708-3p、hsa-miR-3622b-5p、hsa-miR-920、hsa-miR-4722-5p)でプライマーダイマーの形成や増幅不良が認められ、これらの microRNA は測定不可能もしくは測定値に正確性がないと判断し、測定対象から除外した。

2-1) hsa-miR-671-5p

hsa-miR-671-5p は、パーキンソン病群において、健常群 (p = 0.0280) および MSA-C 群 (p = 0.0459)と比較して有意に発現が低下していた。また、MSA-P 群においても、健常群 (p = 0.0146) および MSA-C 群 (p = 0.0187)と比較して有意な発現低下を認めた。**(図 5a)**

2-2) hsa-miR-19b-3p

hsa-miR-19b-3p は、パーキンソン病群において健常対照群 (p = 0.0080)、MSA-C 群 (p = 0.0015)、および MSA-P 群 (p = 0.0247)に対して有意な発現量増加を認めた。**(図 5b)**

2-3) hsa-miR-24-3p

また、パーキンソン病群においては、hsa-miR-24-3p の発現量も MSA-C 群と比較して有意に上昇していた。(p = 0.0381)**(図 5c)**

2-4) その他の対象 microRNA

RT-qPCR による解析を施行した他の 3 種の microRNA (hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-4736)は群間で発現量に有意な差は認められなかった。**(図 6)**

表 4　RT-qPCR 対象の臨床的背景

	n	女性	男性	年齢	罹病期間 (年)	Clinical Scale				
						UMSARS				
						Part 1	Part 2	Part 3 (ΔsBP)	Part 3 (ΔdBP)	Part 4
MSA-C	31	16 (51.6%)	15 (48.4%)	60.7 ± 1.7	3.1 ± 0.3	16.8 ± 1.6	15.9 ± 1.7	-28.9 ± 4.3	-12.3 ± 2.6	2.0 ± 0.2
MSA-P	30	17 (56.7%)	13 (43.3%)	68.1 ± 1.3	3.0 ± 0.3	19.6 ± 1.7	22.3 ± 1.9	-20.6 ± 3.2	-10.3 ± 2.5	2.9 ± 0.2
						UPDRS				
						Part 1	Part 2	Part 3	Part 4	
PD	28	15 (53.6%)	13 (46.4%)	68.9 ± 1.3	9.6 ± 1.0	2.6 ± 0.4	12.8 ± 1.8	25.3 ± 3.4	2.1 ± 0.5	
健常対照群	28	13 (46.4%)	15 (53.6%)	63.2 ± 1.3						

(mean ± S.E.)

MSA, 多系統萎縮症; PD, パーキンソン病; UMSARS, Unified Multiple System Atrophy Rating Scale;
ΔsBP, 起立時の収縮期血圧低下; ΔdBP、起立時の拡張期血圧低下; S.E., 標準誤差

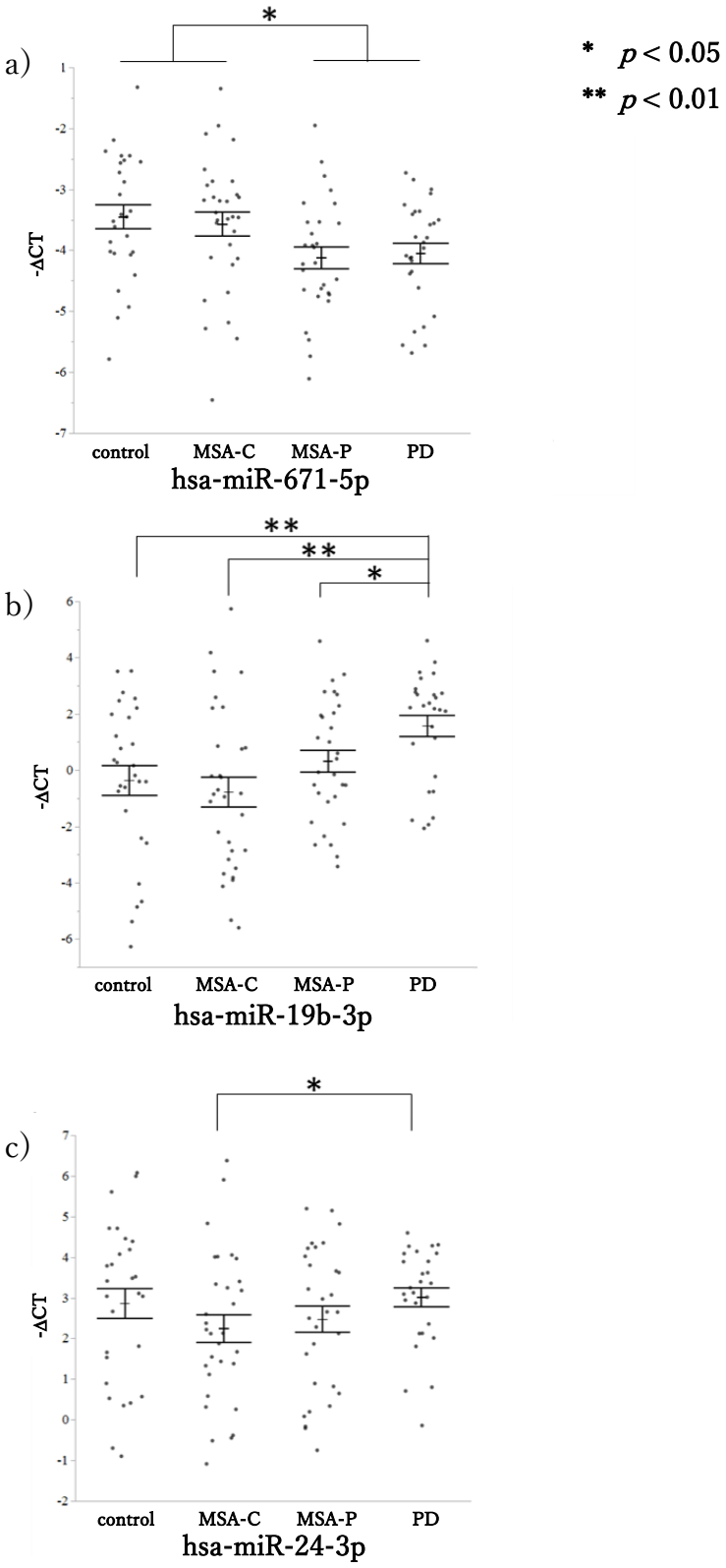


図 5　hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の-ΔCT 値の比較

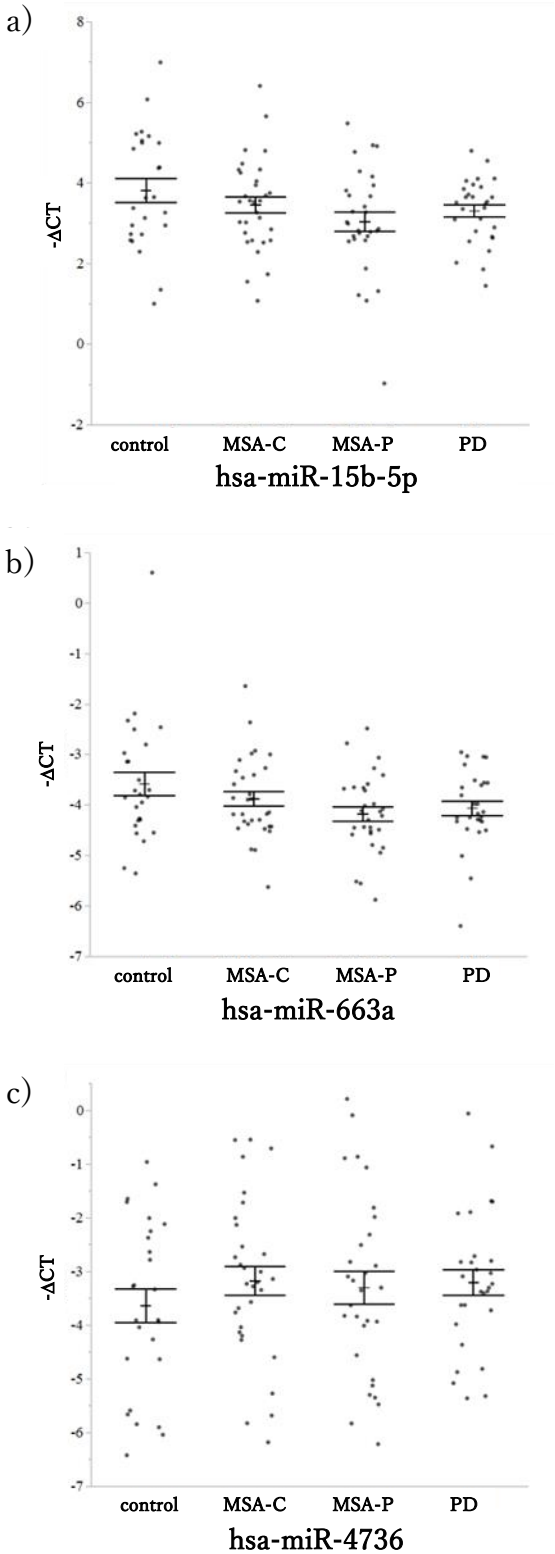


図 6　hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-663a、hsa-miR-4736 の-ΔCT 値の比較

RT-qPCR 法による解析では、MSA-C と健常対照群、多系統萎縮症群 (MSA-C + MSA-P)と健常対照で発現量に有意差がある microRNA は同定できず、マイクロアレイ解析の結果を再現することは出来なかった。また、RT-qPCR を施行した各 microRNA と患者背景 (年齢、性別、罹病期間、臨床評価スケール)との相関は認められなかった。

一方で、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量には強い相関 (r = 0.8207、p < 0.0001)が認められた。**(図 7)**

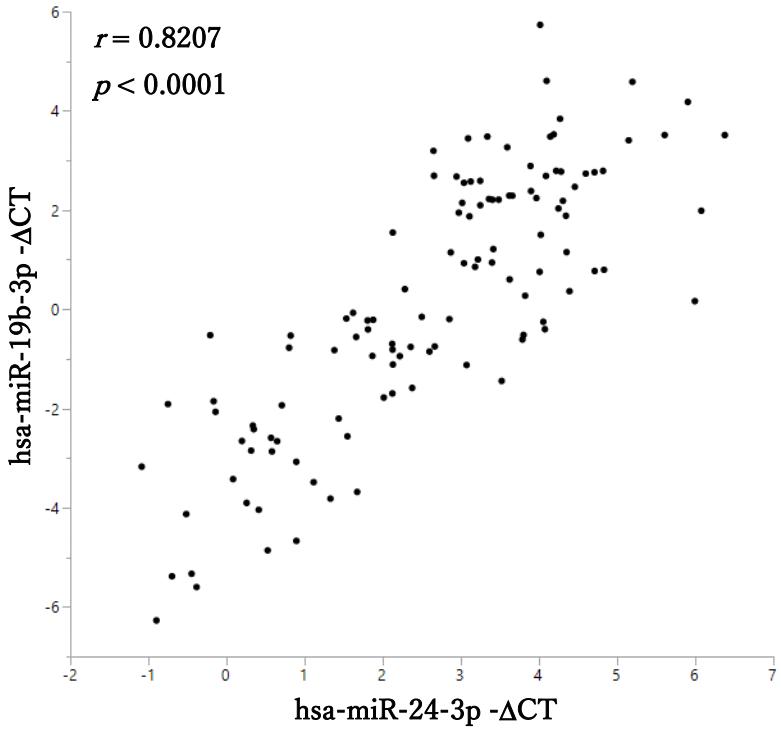


図 7　hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量の相関

microRNA は、年齢によってそのプロファイルが変化する可能性が報告されている(Margolis et al., 2017; Noren Hooten et al., 2013)。本研究では年齢に群間での有意差が認められているため、多系統萎縮症やパーキンソン病の好発年齢である 50 – 75 歳の症例のみを対象としたサブグループ解析も施行した。この解析においても、hsa-miR-671-5p の発現量が健常対照群と比べ、MSA-P 群 (p = 0.0410) とパーキンソン病群 (p = 0.0359)で有意に低下していることが示された。MSA-C 群と比較した場合には統計学的有意に達さなかったが、発現量が低下している傾向が認められた。また、hsa-miR-19b-3p の発現量はパーキンソン病で健常対照群 ($p < 0.05$)、MSA-C 群 ($p < 0.05$) および MSA-P 群 ($p < 0.05$)と比較して、有意な発現量の増加が確認された。**(図 8)**

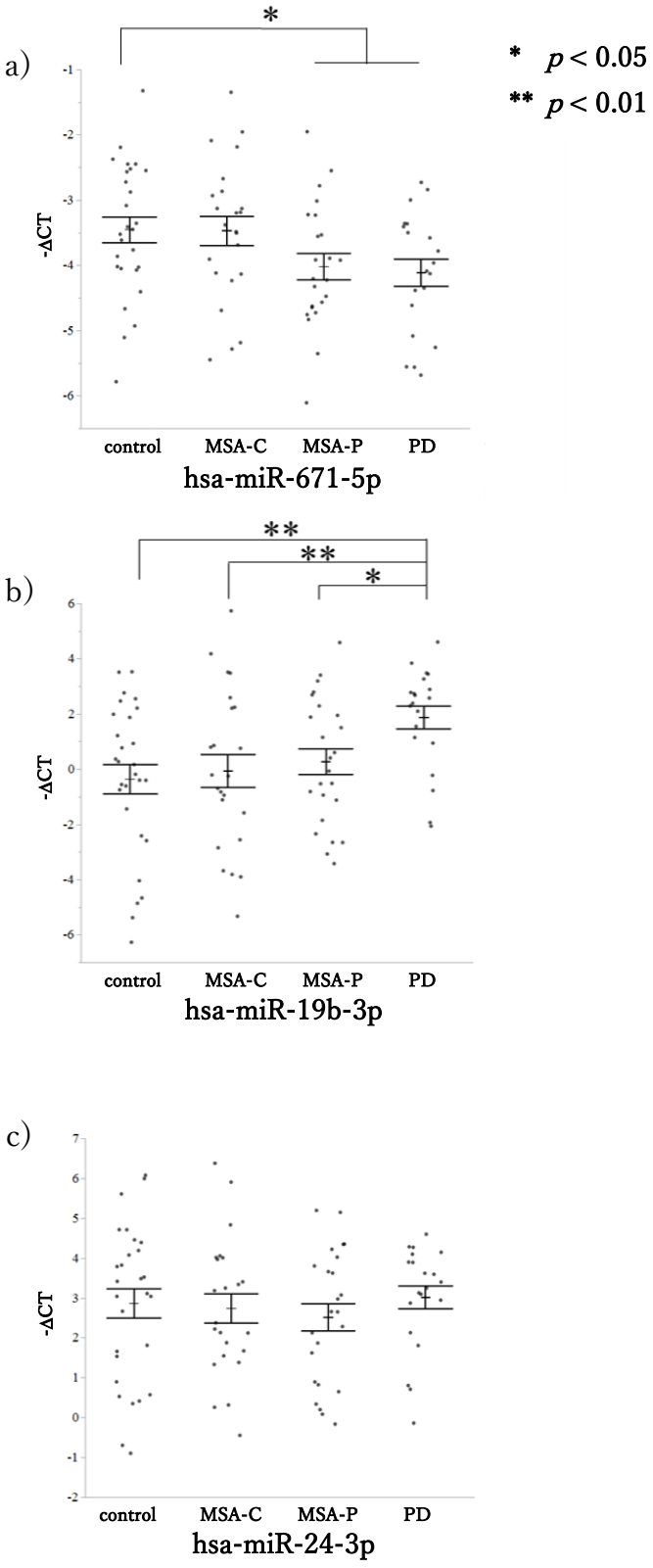


図 8　50-75 歳を対象とした hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の -ΔCT 値の比較

3. Enrichment 解析による Gene Ontology プロセスの検索

miRmap を用いて hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子をそれぞれ 50 遺伝子ずつ抽出した。**(表 5)**

Enrichment 解析によって、hsa-miR-671-5p の予測標的遺伝子に関連する Gene Ontology プロセスの上位 15 プロセス抽出したところ、筋収縮、神経分化、神経系発達などに関与する複数のプロセスが含まれていることが確認された。**(表 6)**

hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子についても同様の検討を行ったところ、hsa-miR-19b-3p との関連が示唆されるプロセスには神経伝達物質のエキソサイトーシス、hsa-miR-24-3p との関連が示唆されるプロセスにはシナプス伝達や神経伝達物質の再取り込みに関与するプロセスが複数含まれていることが判明した。**(表 7、8)**

また、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現に強い相関が認められたことより、これらの microRNA の予測標的遺伝子に共通する Gene Ontology プロセスの検索を行ったところ、ドパミンやカテコラミン再取り込みやドパミン分泌に関与する Gene Ontology プロセスが含まれることが分かった。**(表 9)**

また、それぞれの microRNA の予測標的遺伝子にはパーキンソン病や多系統萎縮症の発症との関連が示唆されている遺伝子や遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子などが複数含まれていた。しかし、miRmap による標的予測の上位 50 種には含まれていなかったため、enrichment 解析の対象としなかった。具体的には hsa-miR-19b-3p の予測標的遺伝子には *FMR1* (miRmap score: 94.89)、*LRRK2* (miRmap score: 84.55)、*COQ2* (miRmap score: 42.68)が含まれ、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子には *HIP1R* (miRmap score: 98.20)、*ATP13A2* (miRmap score: 85.30)、*SYT11* (miRmap score: 79.01)、*RAB39B* (miRmap score: 78.96) が含まれ、hsa-miR-671-5p の予測標的遺伝子には *CHCHD2* (miRmap score: 93.34)、*LRRK2* (miRmap score: 95.15)、*PLA2G6* (miRmap score: 79.87)、*EDN1* (miRmap score: 90.26)、*SNCA* (miRmap score: 71.44) が含まれていた。

表 5　miRmap を用いて抽出した各 microRNA の予測標的遺伝子 (上位 50 種)

	hsa-miR-19b-3p		hsa-miR-24-3p		hsa-miR-671-5p	
	Gene	miRmap score	Gene	miRmap score	Gene	miRmap score
1	*ATXN1*	99.657	*BOK*	99.981	*MDM4*	99.916
2	*RPS6KA5*	99.546	*ORAI2*	99.977	*ITSN1*	99.883
3	*CDS1*	99.387	*FTO*	99.949	*SLC30A6*	99.879
4	*CLOCK*	99.364	*FOXK1*	99.858	*PTPRT*	99.864
5	*ZMYND11*	99.270	*VPS53*	99.842	*CRAMP1L*	99.851
6	*SECISBP2L*	99.203	*TAOK1*	99.841	*MR1*	99.800
7	*SLC30A7*	99.199	*PGPEP1*	99.839	*SSR1*	99.773
8	*TNRC6B*	99.191	*ENTPD1*	99.836	*DLGAP2*	99.746
9	*MDM4*	99.187	*MTHFR*	99.821	*USP46*	99.728
10	*AFF1*	99.070	*SOGA1*	99.817	*C1orf21*	99.701
11	*CHIC1*	99.032	*LRRC20*	99.776	*EHD3*	99.677
12	*TSC1*	99.030	*AP3S2*	99.770	*C10orf25*	99.670
13	*STOX2*	98.990	*DRAXIN*	99.770	*SATB2*	99.666
14	*CAND1*	98.809	*CHST4*	99.759	*PI4K2A*	99.660
15	*ACSL4*	98.798	*KCNJ5*	99.752	*SYPL2*	99.646
16	*SKIDA1*	98.623	*MLEC*	99.744	*CAMK1D*	99.624
17	*LRP2*	98.610	*LRPAP1*	99.697	*PACSIN1*	99.594
18	*PMEPA1*	98.562	*RAB3B*	99.682	*ADRA2B*	99.572
19	*ARHGEF26*	98.520	*RRP8*	99.678	*BCL9L*	99.557
20	*FICD*	98.376	*PRIMA1*	99.664	*LIX1L*	99.557
21	*EXOC5*	98.355	*ITSN1*	99.641	*DVL3*	99.546
22	*ENPP5*	98.322	*TMEM154*	99.640	*ANKH*	99.545
23	*KLF7*	98.292	*TMEM178B*	99.621	*PPM1L*	99.533
24	*ZNF217*	98.270	*FAM168B*	99.610	*SLC6A11*	99.519
25	*CEP350*	98.247	*hsa-mir-4763*	99.593	*SLIT3*	99.515
26	*ZNF677*	98.189	*IBA57*	99.469	*CPNE2*	99.481
27	*LGALSL*	98.175	*NFASC*	99.467	*SLC1A2*	99.480
28	*TRIM23*	98.119	*AVL9*	99.465	*GALNT10*	99.478
29	*DSEL*	98.113	*NDST1*	99.444	*FGD6*	99.443
30	*SYNM*	98.091	*GINS2*	99.436	*XPR1*	99.431
31	*PRUNE2*	97.991	*PPARGC1B*	99.432	*SPTB*	99.428
32	*CYLD*	97.958	*DNAJB2*	99.420	*PSMB2*	99.422
33	*HBP1*	97.909	*PHF15*	99.418	*CCDC6*	99.404
34	*CREB3L2*	97.865	*SUSD2*	99.415	*KCNA6*	99.395
35	*GJA1*	97.825	*SCAMP5*	99.398	*SMAD3*	99.384
36	*ZNF831*	97.805	*LIMD1*	99.392	*LIN9*	99.376
37	*ABCC3*	97.801	*ZBTB44*	99.376	*GPR107*	99.366
38	*DNAJC16*	97.789	*RAB3IP*	99.349	*C16orf72*	99.346
39	*RBBP8*	97.779	*CDC42EP3*	99.348	*CFL2*	99.340
40	*ZNF238*	97.752	*PDXK*	99.347	*SYT2*	99.339
41	*ZC3HAV1L*	97.744	*SH3PXD2A*	99.344	*XCR1*	99.320
42	*KBTBD8*	97.730	*CCDC93*	99.341	*KRT9*	99.311
43	*ANKRD13C*	97.689	*GNE*	99.329	*EIF4EBP2*	99.279
44	*KCNA4*	97.676	*KLHL3*	99.297	*CHRM3*	99.264
45	*SYT1*	97.659	*C1orf21*	99.286	*DCAF17*	99.258
46	*SYT6*	97.657	*NLN*	99.283	*SYT9*	99.252
47	*BEND4*	97.642	*GRAMD1B*	99.264	*PBX1*	99.228
48	*FEM1C*	97.632	*PLXNA4*	99.251	*SLC8A2*	99.204
49	*TRIM2*	97.577	*TMEM213*	99.247	*OTUB2*	99.199
50	*BMPR2*	97.535	*IFFO2*	99.241	*GREM2*	99.192

表 6　hsa-miR-671-5p との関連が示唆された Gene Ontology プロセス

	Gene Ontology processes	*p*-value	FDR
1	regulation of vascular smooth muscle contraction	5.47E-12	1.95E-08
2	positive regulation of smooth muscle contraction	7.63E-11	1.36E-07
3	positive regulation of muscle contraction	1.69E-09	2.01E-06
4	regulation of neuron differentiation	3.71E-09	2.38E-06
5	positive regulation of neuron differentiation	3.75E-09	2.38E-06
6	nervous system development	4.14E-09	2.38E-06
7	phospholipase C-activating G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	4.67E-09	2.38E-06
8	regulation of system process	6.77E-09	2.77E-06
9	saliva secretion	7.77E-09	2.77E-06
10	adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	7.77E-09	2.77E-06
11	secretion by tissue	1.43E-08	4.55E-06
12	regulation of blood circulation	1.53E-08	4.55E-06
13	regulation of muscle contraction	2.27E-08	5.66E-06
14	negative regulation of catecholamine secretion	2.33E-08	5.66E-06
15	regulation of smooth muscle contraction	2.39E-08	5.66E-06

FDR, false discovery rate

表 7　hsa-miR-19b-3p との関連が示唆された Gene Ontology プロセス

	Gene Ontology processes	*p*-value	FDR
1	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	1.723E-07	3.817E-04
2	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	3.867E-07	4.283E-04
3	negative regulation of cellular biosynthetic process	9.213E-07	6.802E-04
4	negative regulation of biosynthetic process	1.384E-06	7.666E-04
5	regulation of macromolecule biosynthetic process	3.251E-06	1.085E-03
6	regulation of biosynthetic process	3.921E-06	1.085E-03
7	histone H2A-S1 phosphorylation	4.408E-06	1.085E-03
8	negative regulation of prostaglandin secretion	4.408E-06	1.085E-03
9	fast、calcium ion-dependent exocytosis of neurotransmitter	4.408E-06	1.085E-03
10	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	7.074E-06	1.567E-03
11	regulation of cellular biosynthetic process	9.620E-06	1.937E-03
12	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	1.411E-05	2.605E-03
13	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	2.230E-05	3.800E-03
14	acrosomal vesicle exocytosis	2.638E-05	3.895E-03
15	histone H3-S28 phosphorylation	2.638E-05	3.895E-03

FD, false discovery rate

表 8　hsa-miR-24-3p との関連が示唆された Gene Ontology プロセス

	Gene Ontology processes	*p*-value	FDR
1	protein sulfation	6.213E-07	9.450E-04
2	N-acetylglucosamine metabolic process	8.303E-06	6.314E-03
3	sulfation	1.466E-05	7.432E-03
4	peptidyl-cysteine methylation	3.885E-05	1.107E-02
5	glucosamine-containing compound metabolic process	4.274E-05	1.107E-02
6	positive regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission	5.820E-05	1.107E-02
7	regulation of vesicle size	5.820E-05	1.107E-02
8	positive regulation of catecholamine uptake involved in synaptic transmission	5.820E-05	1.107E-02
9	amino sugar metabolic process	1.920E-04	2.973E-02
10	vesicle-mediated transport	2.389E-04	2.973E-02
11	regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission	2.541E-04	2.973E-02
12	positive regulation of neurotransmitter uptake	2.541E-04	2.973E-02
13	regulation of catecholamine uptake involved in synaptic transmission	2.541E-04	2.973E-02
14	positive regulation of synaptic transmission、dopaminergic	4.028E-04	4.376E-02
15	vesicle-mediated transport in synapse	4.858E-04	4.926E-02

FDR, false discovery rate

表 9

hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p との関連が示された Gene Ontology プロセス

	Gene Ontology processes	err(-log(*p*-Value))	miR-19b-3p		miR-24-3p	
			p-value	FDR	*p*-value	FDR
1	cation transport	8.91E-03	1.95E-01	2.62E-01	2.01E-01	2.99E-01
2	organonitrogen compound catabolic process	1.13E-02	4.91E-01	5.33E-01	4.99E-01	5.63E-01
3	developmental process involved in reproduction	1.13E-02	5.35E-02	1.02E-01	5.01E-02	1.34E-01
4	nitrogen compound transport	1.27E-02	5.37E-03	1.80E-02	4.70E-03	4.43E-02
5	Golgi reassembly	2.03E-02	2.43E-02	5.67E-02	2.08E-02	8.85E-02
6	positive regulation of glomerular filtration	2.13E-02	2.91E-02	6.45E-02	2.49E-02	9.58E-02
7	regulation of systemic arterial blood pressure by vasopressin	2.30E-02	3.86E-02	7.98E-02	3.31E-02	1.11E-01
8	operant conditioning	2.30E-02	3.86E-02	7.98E-02	3.31E-02	1.11E-01
9	regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission	2.32E-02	1.53E-03	6.62E-03	1.12E-03	2.07E-02
10	regulation of catecholamine uptake involved in synaptic transmission	2.32E-02	1.53E-03	6.62E-03	1.12E-03	2.07E-02
11	platelet dense granule organization	2.38E-02	4.33E-02	8.70E-02	3.72E-02	1.18E-01
12	negative regulation of dopamine secretion	2.38E-02	4.33E-02	8.70E-02	3.72E-02	1.18E-01
13	intestine smooth muscle contraction	2.45E-02	4.80E-02	9.42E-02	4.12E-02	1.23E-01
14	interleukin-1 beta secretion	2.45E-02	4.80E-02	9.42E-02	4.12E-02	1.23E-01
15	mast cell chemotaxis	2.45E-02	4.80E-02	9.42E-02	4.12E-02	1.23E-01

FDR, false discovery rate

考察

本研究では多系統萎縮症群、健常対照群を対象としたマイクロアレイ解析によって広範囲の microRNA の発現量変化を比較し、up-regulated microRNA および down-regulated microRNA の検索を行った。さらに、マイクロアレイ法で発現量変化が認められた microRNA のうち、4 種の up-regulated microRNA、７種の down-regulated microRNA の発現量を qPCR 法で定量し、MSA-C 群、MSA-P 群、パーキンソン病群、健常対照群での比較を行った。qPCR 法による解析では、hsa-miR-671-5p 発現がパーキンソン病群、MSA-P 群において MSA-C 群、健常対照群より低下していること、hsa-miR-19b-3p の発現がパーキンソン病群において他群より上昇していること、hsa-miR-24-3p の発現量がパーキンソン病群において MSA-C 群より上昇していることが判明した。マイクロアレイ法による発現の増減を、RT-qPCR 法で再現することができないものもあり、RNA 抽出法の違いや microRNA のラベリング法の違い、測定方法の違い、サンプルサイズの違いなどが結果の乖離に影響を与えたと思われる。しかし、RT-qPCR では定量評価が可能であることや、サンプルサイズが大きかったことより、RT-qPCR 結果を中心に *in silico* 解析や考察を行った。

1)各 microRNA 発現量変化の意義

①hsa-miR-671-5p

マイクロアレイ解析では多系統萎縮症群における hsa-miR-671-5p 発現低下を認めた。qPCR 法による解析では、MSA-P 群、パーキンソン病群で健常対照群、MSA-C 群より hsa-miR-671-5p の発現が低下していたが、MSA-C 群と健常対照群との比較、MSA 群 (MSA-C 群と MSA-P 群を統合した群)と健常対照群との比較では発現量変化は認められなかった。

hsa-miR-671-5p 遺伝子は、7 番染色体長腕に存在し、hsa-miR-671-5p の発現量が、乳癌、膠芽腫、川崎病で変動することが報告されている (Barbagallo et al., 2016; Malgulwar et al., 2017; Tan et al., 2016; Zhang et al., 2018b)。一方で、これまで神経変性疾患における hsa-miR-671-5p の発現量変化の報告はない。

本研究では microRNA 標的遺伝子の予測ツールである miRmap を用いて、hsa-miR-671-5p の予測標的遺伝子を検索し、miRmap score の高い 50 遺伝子を抽出した。抽出された 50 遺伝子に関連する Gene Ontology プロセスの検索するため、MetaCore™ を用いた enrichment 解析によって統計学的有意が強かった上位 15 プロセスを抽出したところ、hsa-miR-671-5p に関連する

可能性がある Gene Ontology プロセスとして、”positive regulation of smooth muscle contraction”、”positive regulation of muscle contraction”、”regulation of muscle contraction”といった筋収縮に関するプロセスが同定された。

一部の microRNA の発現量が運動負荷によって変化することや運動習慣によって変化することが報告されている(Baggish et al., 2011; Dufresne et al., 2018)。本研究において MSA-P 群とパーキンソン病群で認められた hsa-miR-671-5p の発現低下は、パーキンソニズムにともなう日常動作量、運動量の低下やパーキンソニズムで認められる筋トーヌスの亢進(Marusiak et al., 2011)などの症状を反映している可能性がある。しかし、hsa-miR-671-5p が運動負荷、運動習慣や日常活動量によってどのように変化するか検討された報告はなく、また、本研究でもパーキンソン病や多系統萎縮症の重症度と hsa-miR-671-5p の発現量に相関は認められなった。そのため、運動負荷や運動習慣が hsa-miR-671-5p 発現量にどのように影響を及ぼすか、また、MSA-P 患者、パーキンソン病患者で hsa-miR-671-5p の発現量が経時的にどのように変化していくかを検討していく必要がある。

また、enrichment 解析で得られた Gene Ontology プロセスに”regulation of neuron differentiation”、”positive regulation of neuron differentiation”といった神経分化に関与するプロセスも含まれており、これらのプロセスやプロセスの障害が、パーキンソン病や多系統萎縮症のおける神経細胞脱落やグリオーシスなどに可能性も考えられる。

miRmap による hsa-miR-671-5p の標的遺伝子検索では、上位 50 種には入らなかったが、*LRRK2* (miRmap score: 95.15)、*CHCHD2* (miRmap score: 93.34)、*EDN1* (miRmap score: 90.26)、*PLA2G6* (miRmap score: 79.87)、*SNCA* (miRmap score: 71.44) など、パーキンソン病や多系統萎縮症との関連が報告されている遺伝子が複数含まれていた。

LRRK2 遺伝子は常染色体優性遺伝性の家族性パーキンソン病の原因遺伝子として報告されており(Funayama et al., 2005)、家族性パーキンソン病の 3 - 6%を占めるとされる。また、LRRK2 遺伝子変異は孤発性パーキンソン病の 1%の症例でも認められ、孤発性パーキンソン病のリスク遺伝子になることも報告されている(Healy et al., 2008)。

CHDHD2 遺伝子も常染色体優性遺伝形式の家族性パーキンソン病の原因遺伝子の 1 つとして同定されており(Funayama et al., 2015)、孤発性パーキンソン病症例の一部でも *CHCHD2* 遺伝子変異の関連が報告されている(Yang et al., 2016)。

EDN1 遺伝子は、多系統萎縮症患者を対象としてゲノムワイド関連解析で多系統萎縮症のリスク遺伝子と報告されている(Sailer et al., 2016)。

PLA2G6 遺伝子は常染色体劣性遺伝性の家族性パーキンソン病の原因遺伝子として報告されているほか、乳児神経軸索ジストロフィーの原因遺伝子でもあることが報告されている(Ferreira and Massano, 2017)。

SNCA 遺伝子(Polymeropoulos et al., 1996)も家族性パーキンソン病の原因遺伝子であり、また、GWAS 解析では孤発性パーキンソン病においてもリスク遺伝子となることが報告されている。*SNCA* 遺伝子はα-synuclein をコードする遺伝子であり、多系統萎縮症のリスク遺伝子になることも報告されている(Scholz et al., 2009)。

前記のように、パーキンソン病や多系統萎縮症との関連が報告されている遺伝子が、hsa-miR-671-5p の標的遺伝子候補として挙がっており、これらの遺伝子の発現量の調整がパーキンソン病や多系統萎縮症の発症に関与している可能性がある。

また、hsa-miR-671-5p が Cerebellar Degeneration-Related protein 1 遺伝子 (*CDR1* 遺伝子)の発現を抑制することが報告されている。Hansen らによる HEK 297 細胞を用いた研究では、hsa-miR-671-5p が *CDR1* 遺伝子のナチュラルアンチセンス RNA の発現を抑制し、その結果、*CDR1* messenger RNA 発現量低下が引き起こされることを示している(Hansen et al., 2011)。Barbaggalo らによる研究では、神経膠芽腫細胞において *CDR1* 遺伝子発現量が低下すること、*CDR1* 遺伝子発現量と hsa-miR-671-5p 発現量に負の相関があることが示されている(Barbagallo et al., 2016)。これらの研究結果から、hsa-miR-671-5p が *CDR1* 遺伝子の発現量調整において重要や役割を果たしていることが考えられる。

Cerebellar Degeneration-Related protein 1 は、Dropcho ら研究で発見された蛋白質であり、傍腫瘍性小脳変性症のおける自己抗体の標的タンパク質として発見された(Dropcho et al., 1987)。健常者では中枢神経、特に小脳で強く発現し、心臓、肺、腎臓などでは発現が少ないことが報告されている。一方で、神経芽腫細胞では CDR1 遺伝子発現が低下していること、アルツハイマー型認知症では *CDR1* 遺伝子発現が上昇すること(Bosco et al., 2014)が報告されており、これらの中枢神経疾患の発症と関与している可能性が示唆されている。

多系統萎縮症患者やパーキンソン病における *CDR1* 遺伝子の発現量変化を検討した研究はこれまでない。しかし、*CDR1* 遺伝子が中枢神経に特異的かつ広汎に分布していること、一部神経変性疾患での発現量変化が報告され

ていること、本研究の RT-qPCR において MSA-P 群およびパーキンソン病群で hsa-miR-671-5p の発現低下が認められたことを考慮すると、多系統萎縮症やパーキンソン病の発症に *CDR1* 遺伝子や hsa-miR-671-5p が関与している可能性があり、今後の検討が望まれる。

また、RT-qPCR 法を用いた研究で、MSA-C 群と MSA-P 群で発現量が異なることが示された microRNA はこれまでない。多系統萎縮症は MSA-C と MSA-P に大別され、臨床症状、疫学、病理所見などにおいて異なる点が多い。MSA-C は日本で多いサブタイプであり、病理学的には神経細胞脱落とグリオーシスが橋核、下オリーブ核、小脳皮質を中心に認められ (Lantos, 1998)、脳 MRI でも橋、小脳を中心とした脳萎縮がみとめられる。一方で、MSA-P はアメリカやヨーロッパに多いサブタイプで、病理学的には被殻背外側、黒質の神経変性およびグリオーシスが優位になり、脳 MRI でも被殻の萎縮および背外側の T2 強調画像高信号が目立つ(Kraft et al., 1999; Schulz et al., 1994)。多系統萎縮症は多因子疾患と考えられており、MSA-C と MSA-P における臨床所見、病理学的所見、疫学所見などに相違点が多いことは、MSA-C と MSA-P の発症や病態には異なる遺伝性因子、エピジェネティクス因子、環境因子が関与している可能性を示唆している。hsa-miR-671-5p 発現量変化はこのような相違点を反映している可能性があり、今後、hsa-miR-671-5p の標的遺伝子の更なる検索や生体内での機能の解析を行うことが重要と考えらえる。また、MSA-C と MSA-P で発現量が異なる microRNA は複数存在することが推察されるため、MSA-C、MSA-P 間で発現量異なる microRNA の更なる検索を行うことも非常に重要であると考える。

②hsa-miR-19b-3p

hsa-miR-19b-3p の発現量はマイクロアレイ解析では多系統萎縮症群で発現が低下していた。この結果は RT-qPCR 法では確認できなかったが、RT-qPCR 法による解析ではパーキンソン病群において MSA-C 群、MSA-P 群、健常対照群と比較して発現が有意の増加していた。

hsa-miR-19b-3p の発現量が多系統萎縮症患者やパーキンソン病患者の血清や脳脊髄液において、変動していることが既に報告されている。Botta-Orfila らは TaqMan LowDensity Array と TaqMan RT-qPCR を使用し、特発性パーキンソン病および LRRK2 G2019S 変異を持つ遺伝性パーキンソン病患者の血清中での hsa-miR-19b-3p 発現量が低下していることを報告している(Botta-Orfila et al., 2014)。Cao らは PrimeScript microRNA cDNA Synthesis Kit (Takara Biotechnology)による RT-qPCR 法を用いた解析で、同様に特発性パーキンソン病患者の血清中での hsa-miR-19b-3p 発現量が低下していることを報告しており(Cao et al., 2017)、Schulz らによる meta-analysis でもパーキンソン病患者の血清において、hsa-miR-19b-3p が低下することが報告されている(Schulz et al., 2019)。Marques らは TaqMan MicroRNA primer を用いた研究で、多系統萎縮症患者の脳脊髄液中 hsa-miR-19b-3p の発現量が低下していることを報告している(Marques et al., 2017)。

しかし、パーキンソン病患者、多系統萎縮症患者の血漿を用いて microRNA 解析を行った報告はない。

既報による血清内の hsa-miR-19b-3p 発現量変化と本研究における血漿内の hsa-miR-19b-3p の発現量変化の結果には乖離が認められる。microRNA の発現量は血液凝固過程で変化することが報告されており、今回の結果の乖離の一因である可能性が考えらえる。

miRmap を用いた予測標的遺伝子の検索、enrichment 解析による Gene Ontology プロセスの検索を施行したところ、hsa-miR-19b-3p に関連する Gene Ontology プロセスに神経伝達に関与するプロセス(”fast, calcium ion-dependent exocytosis of neurotransmitter”)が含まれた。

また、miRmap での候補遺伝子には *FMR1* (miRmap score: 94.89)、*LRRK2* (miRmap score: 84.55)、*COQ2* (miRmap score: 42.68)が含まれるなど、パーキンソン病や多系統萎縮症との関連が示された遺伝子が含まれた。

FMR1 遺伝子は脆弱 X 症候群および脆弱 X 随伴振戦/失調症候群 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome(FXTAS))の原因遺伝子である。FXTAS は *FMR1* 遺伝子の 3 塩基(CGC)繰り返し配列の延長によって発症し、成人発

症性の小脳性運動失調症、パーキンソニズム、精神症状を呈する疾患であり、パーキンソン病や多系統萎縮症との類似した経過を辿る場合がある(Hagerman and Hagerman, 2015)。

*COQ2*遺伝子は、日本における家族性多系統萎縮症患者で病原性変異があることが示され、その後孤発性多系統萎縮症においても*COQ2*遺伝子変異が危険因子になることが示された(Multiple-System Atrophy Research, 2013)。

上記のように hsa-miR-19b-3p の予測標的遺伝子にも、パーキンソン病や多系統萎縮症および類似する疾患に関与するものが含まれていた。

一方で hsa-miR-19b-3p 遺伝子は、13 番染色体長腕に他の microRNA (hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR92a)とクラスターを形成して存在し、このクラスターは、miR-17/92 クラスターと呼ばれ、B 細胞性悪性リンパ腫発症への関与が示唆されている他、白血病や乳癌、膵癌、骨肉腫などで発現量が変化することが示されている。(Mogilyansky and Rigoutsos, 2013)。さらに hsa-miR-19b-3p は加齢によっても発現が低下することが示されている(Hackl et al., 2010)。

このように hsa-miR-19b-3p の変化は神経疾患に特異的なものではなく、様々な疾患や状態において変化する。そのため、hsa-miR-19b-3p の変化量の疾患特異性は低い可能性が高く、パーキンソン病における変化の意義については他の microRNA との組み合わせなど、他の因子も含めて検討する必要がある。

③hsa-miR-24-3p

hsa-miR-24-3p はマイクロアレイ解析では多系統萎縮症群で発現が低下していたが、RT-qPCR 法による解析では健常対照群と多系統萎縮症群で発現量に有意差は認められなかった。一方で、RT-qPCR 法による解析で hsa-miR-24-3p がパーキンソン病群において MSA-C 群と比較して有意に発現量の増加を認めた。

hsa-miR-19b-3p と同様に，パーキンソン病や多系統萎縮症のおける hsa-miR-24-3p 発現量の変化は他の研究者によっても報告されている。Vallelunga らは TaqMan LowDensity Array と TaqMan RT-qPCR を使用した研究で、パーキンソン病患者および多系統萎縮症患者の血清中 hsa-miR-24-3p の発現量が増加していることを報告している(Vallelunga et al., 2014)。Marques らは TaqMan MicroRNA primer を用いた研究で、多系統萎縮症患者の脳脊髄液中 hsa-miR-24-3p の発現量が低下していること、パーキンソン病患者の脳脊髄液中 hsa-miR-24-3p の発現量が低下していることを報告している。(Marques et al., 2017)

hsa-miR-24-3p に関連する Gene Ontology プロセスには、”positive regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission”、”positive regulation of catecholamine uptake involved in synaptic transmission”、”regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission”、”positive regulation of neurotransmitter uptake”など、神経伝達物質の再取り込みやシナプス伝導に関するプロセスが多く含まれる。特にドパミン再取り込みなどについてのプロセスも複数含まれることから、パーキンソン病の病態を反映している可能性がある。

また、miRmap を用いた hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子には *HIP1R* (miRmap score: 98.20)、*ATP13A2* (miRmap score: 85.30)、*SYT11* (miRmap score: 79.01) が含まれた。

HIP1R 遺伝子および *SYT11* 遺伝子はパーキンソン病のゲノムワイド関連解析で、パーキンソン病のリスク遺伝子として報告されている。

ATP13A2 遺伝子は Kufor-Rakeb 症候群の原因遺伝子として報告されている。Kufor-Rakeb 症候群は、亜急性、若年性に発症するパーキンソニズム、錐体路徴候が認められる常染色体劣性遺伝性の疾患であり、若年性パーキンソン病との鑑別を要する疾患である。

hsa-miR-24-3p の標的遺伝子にも、パーキンソン病との関連が示唆される遺伝子が複数ふくまれており、今後 hsa-miR-24-3p の *in vitro* での機能の解析が望まれる。

2)hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p 発現量の相関の意義

本研究では hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量に強い相関(r = 0.8207、p < 0.0001)を認めた。

hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量が相関することは、Marques らによるパーキンソン病および多系統萎縮症を対象とした研究でも報告されている(Marques et al., 2017)。hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p をコードする遺伝子は別々の染色体に存在しており、発現量の相関はクラスター形成などによるものではないと考えられる。

microRNA による遺伝子発現制御においては、1 種の microRNA が複数の遺伝子発現の制御を行うこと、1 つの遺伝子が複数の microRNA によって発現調整を受けることが知られている(Bartel, 2004)。

今回の研究で hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量に強い相関が認められたことからは、これら 2 つの microRNA が同一遺伝子の発現制御に関連する可能性や同一のプロセスに関与する可能性が示唆される。そのため、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の候補遺伝子を 100 種抽出し、enrichment 解析により、それらの遺伝子の両方に関連する Gene Ontology プロセスを検索した。その結果、これらの microRNA に同様に関与するプロセスに ”regulation of dopamine uptake involved in synaptic transmission”、”regulation of catecholamine uptake involved in synaptic transmission”という神経伝達物質およびシナプス伝導に関与するプロセスが含まれることが判明した。パーキンソン病ではドパミン産生ニューロンの脱落やシナプス機能障害が認められることが知られており、パーキンソン病の発症にこれらのプロセスの障害が関連する可能性が考慮される。

本研究では *in silico* の解析による予測標的遺伝子で解析を行ったが、各組織に hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量変化や、生体内での機能の研究を行うことによって、これらの microRNA がパーキンソン病発症に及ぼす影響を解析する必要がある。

3) 各 microRNA の診断バイオマーカーとしての有用性

本研究では hsa-miR-671-5p の発現量がパーキンソン病群、MSA-P 群と他群で、hsa-miR-19b-3p の発現量がパーキンソン病群と他群で、hsa-miR-24-3p の発現量がパーキンソン病群と MSA-C 群で異なることが示された。

そのため、各 microRNA の診断バイオマーカーとしての有用性を検討するため、発現量の有意差が認められた各 microRNA 群間で Receiver Operating Characteristic analysis (ROC)解析を施行した。(図 9)

しかし、この解析では充分な Area Under Curve (AUC)を得ることができず、これらの microRNA 単独での各疾患の診断や鑑別を行うことは困難であった。

この一因として、パーキンソン病や多系統萎縮症は多因子疾患と考えられており、個々の microRNA の発現量変化が発症や疾患進行に及ぼす影響が小さいことが推察される。そのため、既知の疾患関連遺伝子や画像所見など他の指標と microRNA 発現量の変化を組み合わせることによって、診断バイオマーカーとして活用できる可能性があり、今後複数の microRNA の発現変化の組み合わせや他の疾患バイオマーカー、診断指標との組み合わせによる診断能を検討していく必要がある。

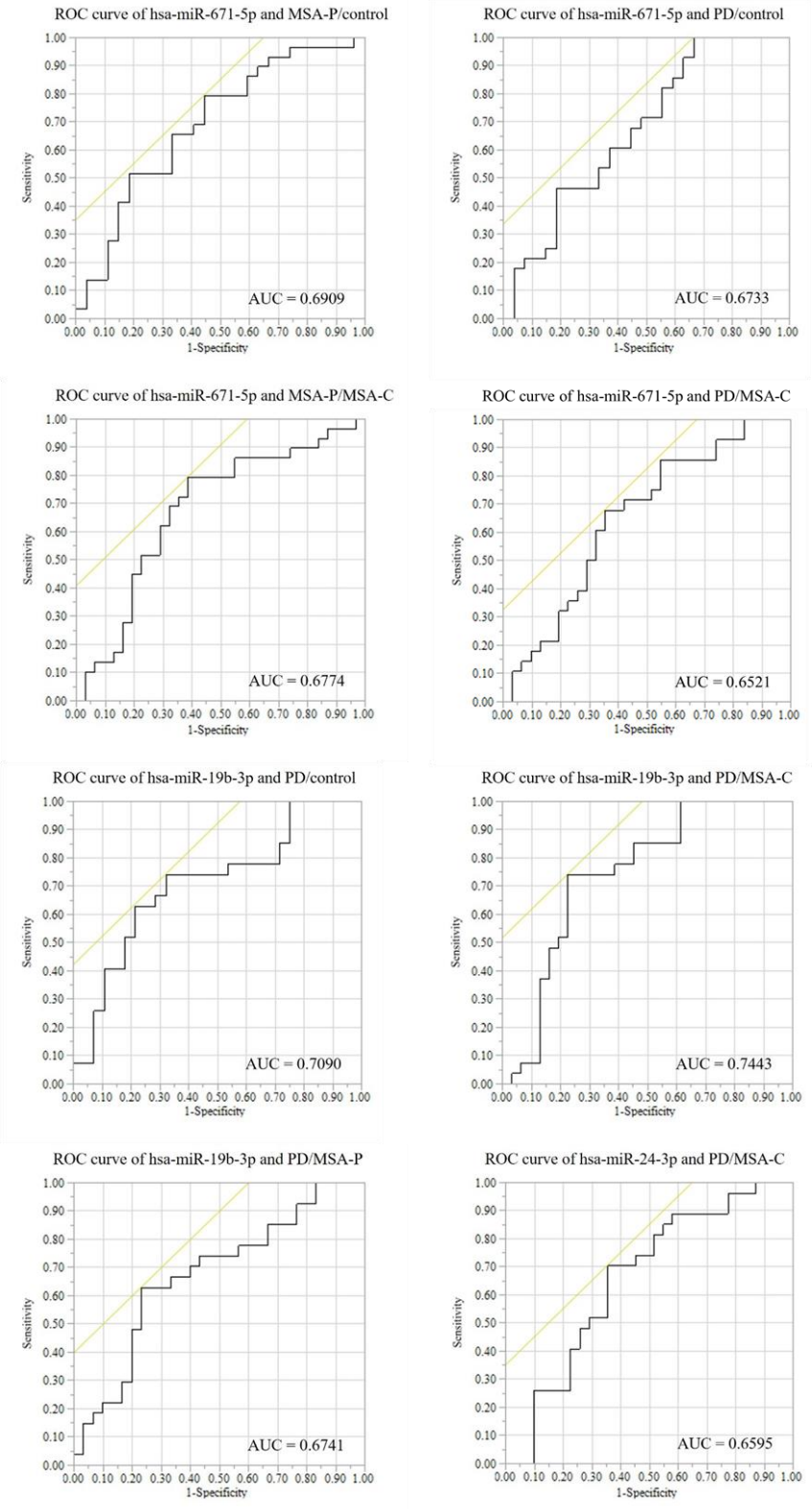


図 9　hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19-3p、hsa-miR-24-3p 発現量による MSA-C 群、MSA-P 群、パーキンソン病群、健常対照群間の ROC 解析

4) 今後の課題

本研究では単独で診断に有用なバイオマーカーの同定には至らず、パーキンソン病や多系統萎縮症が多因子疾患と考えられていることが一つの要因と思われる。しかし、多系統萎縮症やパーキンソン病で変化を認めるmicroRNA を複数組み合わせることによって診断や病態解明に至る可能性があり、今後も各疾患で発現が異なるmicroRNA の検索を継続し、バイオマーカーとしての有用性を検討していくことが重要と考えられる。

多系統萎縮症が希少疾患であり、本研究で対象とした多系統萎縮症の症例数が比較的少ないことも診断バイオマーカーの同定を困難にした一因と思われる。また、本研究の多系統萎縮症患者はすべてprobable MSA 患者であり、病理解剖によって証明されたdefinite MSA の症例は含まれなかった。多系統萎縮症の正確な生前診断が困難な事を考慮すると、definite MSA を対象とした大きなコホートを用いて、本研究の結果の再現性や他のmicroRNA 発現量の変化を検討していく必要がある。

また、今回研究に含まれたパーキンソン病患者の多くは既に内服治療を受けている状態で血液検体採取が行われており、抗パーキンソン病薬がmicroRNA の発現量に変化を与えた可能性は否定できない。そのため、各パーキンソン病薬が血漿microRNA 発現量に及ぼす影響について検討していく必要がある。

結論

本研究から以下の新しい知見を得た。

- マイクロアレイによる解析で、多系統萎縮症で発現量が有意に増加している microRNA を 4 種、有意に低下している microRNA を 75 種同定した。
- RT-qPCR による解析で、hsa-miR-671-5p の発現量が MSA-P 群、パーキンソン病群で他群より有意に減少、hsa-miR-19b-3p の発現量がパーキンソン病群で他群より有意に増加、hsa-miR-24-3p の発現量がパーキンソン病群で MSA-C 群より有意に増加していた。
- hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量に強い相関を認めた。

hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子の検索および enrichment 解析では、hsa-miR-19b-3p が神経伝達に関するプロセス、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するプロセス、hsa-miR-671-5p が筋収縮や神経発達に関連するプロセスに関与していることが示唆された。さらに hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子には、パーキンソン病や多系統萎縮症との関与が指摘されている遺伝子が複数含まれ、これらの microRNA がパーキンソン病や多系統萎縮症の病態を反映している可能性が示唆された。

本研究では hsa-miR-671-5p の発現量が MSA-C と MSA-P で有意に異なることが示され、MSA-C と MSA-P における病態や症状の違いを反映している可能性がある。これまで MSA-C と MSA-P で発現量が異なる microRNA の報告はなく、これら二つの多系統萎縮症サブタイプ間で発現が異なる microRNA をさらに検索していくことが望まれる。

健常者、多系統萎縮症患者、パーキンソン病患者で、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の経時的変化を評価することや、他疾患や他検体での発現量変化を評価することによって、本研究で認めた microRNA の発現量変化の疾患特異性、発現量変化に寄与する因子やバイオマーカーとしての有用性を検討する必要がある。

また、本研究では microRNA が関与する病態やプロセスを *in silico* で検討したが、今後、*in vivo*、*in vitro* でも microRNA の機能解析、microRNA の標的遺伝子の検索、標的遺伝子の機能の評価を行うことによって、本研究で見いだされた microRNA 発現量変化の意義が明確にされることが期待される。

本研究で同定されたそれぞれの microRNA 単独では、診断バイオマーカーとして有用性が低いが、複数の microRNA を組み合わせることによって有用な診断バイオマーカーになる可能性があり、多系統萎縮症、パーキンソン病で発現量が変化する microRNA を継続的な検索を行っていく必要がある。

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、ご指導を賜り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　名誉教授 佐々木　秀直先生に深謝申し上げます。また、研究につきご助言、ご指導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准教授 矢部　一郎先生に心から御礼申し上げます。さらにご指導また、研究計画や結果解析にご助言および多大なご協力をいただいた公益財団法人がん研究会　シニアアドバイザー　内海　潤先生に心より感謝申し上げます。さらに貴重なご助言と技術指導を賜りました、北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科 岩田　育子先生、同研究員　浜　結香様、木村　麻利様に心より御礼申し上げます。

また、本研究遂行にあたり多大なご協力をいただいた釧路労災病院神経内科　津坂　和文先生、帯広厚生病院神経内科　保前　英希先生、　同加納崇裕先生、北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科　松島　理明先生、白井　慎一先生、長沼　亮滋先生、佐藤　智香先生に感謝申し上げます。

最後に、本研究のご協力いただきました患者様、家族の方々および健常ボランディアの方々に深く感謝の言葉を申し上げさせていただきたいと思います。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない.

引用文献

Adler, C.H., Beach, T.G., Hentz, J.G., Shill, H.A., Caviness, J.N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M.N., Sue, L.I., Jacobson, S.A., Belden, C.M., *et al.* (2014). Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. Neurology *83*, 406-412.

Baggish, A.L., Hale, A., Weiner, R.B., Lewis, G.D., Systrom, D., Wang, F., Wang, T.J., and Chan, S.Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. J Physiol *589*, 3983-3994.

Barbagallo, D., Condorelli, A., Ragusa, M., Salito, L., Sammito, M., Banelli, B., Caltabiano, R., Barbagallo, G., Zappala, A., Battaglia, R., *et al.* (2016). Dysregulated miR-671-5p / CDR1-AS / CDR1 / VSNL1 axis is involved in glioblastoma multiforme. Oncotarget *7*, 4746-4759.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell *116*, 281-297.

Ben-Shlomo, Y., Wenning, G.K., Tison, F., and Quinn, N.P. (1997). Survival of patients with pathologically proven multiple system atrophy: a meta-analysis. Neurology *48*, 384-393.

Bosco, P., Spada, R., Caniglia, S., Salluzzo, M.G., and Salemi, M. (2014). Cerebellar degeneration-related autoantigen 1 (CDR1) gene expression in Alzheimer's disease. Neurol Sci *35*, 1613-1614.

Botta-Orfila, T., Morato, X., Compta, Y., Lozano, J.J., Falgas, N., Valldeoriola, F., Pont-Sunyer, C., Vilas, D., Mengual, L., Fernandez, M., *et al.* (2014). Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease. J Neurosci Res *92*, 1071-1077.

Braune, S., Reinhardt, M., Bathmann, J., Krause, T., Lehmann, M., and Lucking, C.H. (1998). Impaired cardiac uptake of meta-[123I]iodobenzylguanidine in Parkinson's disease with autonomic failure. Acta Neurol Scand *97*, 307-314.

Cao, X.Y., Lu, J.M., Zhao, Z.Q., Li, M.C., Lu, T., An, X.S., and Xue, L.J. (2017). MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. Neurosci Lett *644*, 94-99.

Catafau, A.M., Tolosa, E., and Da, T.C.U.P.S.S.G. (2004). Impact of dopamine transporter SPECT using 123I-Ioflupane on diagnosis and management of patients with clinically uncertain Parkinsonian syndromes. Mov Disord *19*, 1175-1182.

da Silva, F.C., Iop, R.D., Vietta, G.G., Kair, D.A., Gutierres Filho, P.J., de Alvarenga, J.G.,

and da Silva, R. (2016). microRNAs involved in Parkinson's disease: A systematic review. Mol Med Rep *14*, 4015-4022.

Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K.*, et al.* (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. Lancet Neurol *8*, 1150-1157.

Dropcho, E.J., Chen, Y.T., Posner, J.B., and Old, L.J. (1987). Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 4552-4556.

Dufresne, S., Rebillard, A., Muti, P., Friedenreich, C.M., and Brenner, D.R. (2018). A Review of Physical Activity and Circulating miRNA Expression: Implications in Cancer Risk and Progression. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *27*, 11-24.

Fahn S, E.R., members of the UPDRS Development Committee. (1987). Unified Parkinson's disease rating scale. In Recent developments in Parkinson's disease, M.C. Fahn D, Calne D, Goldstein M, ed. (Florham Park: Macmillan Healthcare Information).

Fanciulli, A., and Wenning, G.K. (2015). Multiple-system atrophy. N Engl J Med *372*, 249-263.

Ferreira, M., and Massano, J. (2017). An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. Acta Neurol Scand *135*, 273-284.

Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S., and Obata, F. (2005). An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. Ann Neurol *57*, 918-921.

Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H.*, et al.* (2015). CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. The Lancet Neurology *14*, 274-282.

Gilman, S., Wenning, G.K., Low, P.A., Brooks, D.J., Mathias, C.J., Trojanowski, J.Q., Wood, N.W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C.J.*, et al.* (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. Neurology *71*, 670-676.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., and Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol *9*, 13-24.

Graham, J.G., and Oppenheimer, D.R. (1969). Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. J Neurol Neurosurg Psychiatry *32*, 28-34.

Hackl, M., Brunner, S., Fortschegger, K., Schreiner, C., Micutkova, L., Muck, C., Laschober, G.T., Lepperdinger, G., Sampson, N., Berger, P.*, et al.* (2010). miR-17, miR-19b, miR-20a,

and miR-106a are down-regulated in human aging. Aging Cell *9*, 291-296.
Hagerman, P.J., and Hagerman, R.J. (2015). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. Ann N Y Acad Sci *1338*, 58-70.
Hansen, T.B., Wiklund, E.D., Bramsen, J.B., Villadsen, S.B., Statham, A.L., Clark, S.J., and Kjems, J. (2011). miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. EMBO J *30*, 4414-4422.
Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S.*, et al.* (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. The Lancet Neurology *7*, 583-590.
Issler, O., and Chen, A. (2015). Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci *16*, 201-212.
Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. The Lancet *386*, 896-912.
Kim, H.J., Jeon, B.S., Lee, J.Y., and Yun, J.Y. (2011). Survival of Korean patients with multiple system atrophy. Mov Disord *26*, 909-912.
Kollensperger, M., Geser, F., Ndayisaba, J.P., Boesch, S., Seppi, K., Ostergaard, K., Dupont, E., Cardozo, A., Tolosa, E., Abele, M.*, et al.* (2010). Presentation, diagnosis, and management of multiple system atrophy in Europe: final analysis of the European multiple system atrophy registry. Mov Disord *25*, 2604-2612.
Kraft, E., Schwarz, J., Trenkwalder, C., Vogl, T., Pfluger, T., and Oertel, W.H. (1999). The combination of hypointense and hyperintense signal changes on T2-weighted magnetic resonance imaging sequences: a specific marker of multiple system atrophy? Arch Neurol *56*, 225-228.
Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science *294*, 853-858.
Lantos, P.L. (1998). The definition of multiple system atrophy: A review of recent developments. J Neuropath Exp Neur *57*, 1099-1111.
Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell *75*, 843-854.
Low, P.A., Reich, S.G., Jankovic, J., Shults, C.W., Stern, M.B., Novak, P., Tanner, C.M., Gilman, S., Marshall, F.J., Wooten, F.*, et al.* (2015). Natural history of multiple system atrophy in the USA: a prospective cohort study. The Lancet Neurology *14*, 710-719.
Mahoney, F.I., and Barthel, D.W. (1965). Functional Evaluation: The Barthel Index. Md State Med J *14*, 61-65.
Malgulwar, P.B., Pathak, P., Singh, M., Kale, S.S., Suri, V., Sarkar, C., and Sharma, M.C.

(2017). Downregulation of SMARCB1/INI1 expression in pediatric chordomas correlates with upregulation of miR-671-5p and miR-193a-5p expressions. Brain Tumor Pathol *34*, 155-159.

Margolis, L.M., Lessard, S.J., Ezzyat, Y., Fielding, R.A., and Rivas, D.A. (2017). Circulating MicroRNA Are Predictive of Aging and Acute Adaptive Response to Resistance Exercise in Men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci *72*, 1319-1326.

Marques, T.M., Kuiperij, H.B., Bruinsma, I.B., van Rumund, A., Aerts, M.B., Esselink, R.A.J., Bloem, B.R., and Verbeek, M.M. (2017). MicroRNAs in Cerebrospinal Fluid as Potential Biomarkers for Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. Mol Neurobiol *54*, 7736-7745.

Marusiak, J., Jaskolska, A., Budrewicz, S., Koszewicz, M., and Jaskolski, A. (2011). Increased muscle belly and tendon stiffness in patients with Parkinson's disease, as measured by myotonometry. Mov Disord *26*, 2119-2122.

Matsushima, M., Yabe, I., Oba, K., Sakushima, K., Mito, Y., Takei, A., Houzen, H., Tsuzaka, K., Yoshida, K., Maruo, Y.*, et al.* (2016). Comparison of Different Symptom Assessment Scales for Multiple System Atrophy. Cerebellum *15*, 190-200.

Max, K.E.A., Bertram, K., Akat, K.M., Bogardus, K.A., Li, J., Morozov, P., Ben-Dov, I.Z., Li, X., Weiss, Z.R., Azizian, A.*, et al.* (2018). Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. Proc Natl Acad Sci U S A *115*, E5334-E5343.

Mogilyansky, E., and Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. Cell Death Differ *20*, 1603-1614.

Multiple-System Atrophy Research, C. (2013). Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med *369*, 233-244.

Noren Hooten, N., Fitzpatrick, M., Wood, W.H., 3rd, De, S., Ejiogu, N., Zhang, Y., Mattison, J.A., Becker, K.G., Zonderman, A.B., and Evans, M.K. (2013). Age-related changes in microRNA levels in serum. Aging (Albany NY) *5*, 725-740.

Orimo, S., Amino, T., Itoh, Y., Takahashi, A., Kojo, T., Uchihara, T., Tsuchiya, K., Mori, F., Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (2005). Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. Acta Neuropathol *109*, 583-588.

Osaki, Y., Ben-Shlomo, Y., Lees, A.J., Wenning, G.K., and Quinn, N.P. (2009). A validation exercise on the new consensus criteria for multiple system atrophy. Mov Disord *24*, 2272-2276.

Papapetropoulos, S., Tuchman, A., Laufer, D., Papatsoris, A.G., Papapetropoulos, N., and Mash, D.C. (2007). Causes of death in multiple system atrophy. J Neurol Neurosurg Psychiatry *78*, 327-329.

Papp, M.I., Kahn, J.E., and Lantos, P.L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). J Neurol Sci *94*, 79-100.

Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A.*, et al.* (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. Science *274*, 1197-1199.

Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E.*, et al.* (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. Mov Disord *30*, 1591-1601.

Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov *16*, 203-221.

Sailer, A., Scholz, S.W., Nalls, M.A., Schulte, C., Federoff, M., Price, T.R., Lees, A., Ross, O.A., Dickson, D.W., Mok, K.*, et al.* (2016). A genome-wide association study in multiple system atrophy. Neurology *87*, 1591-1598.

Sakushima, K., Nishimoto, N., Nojima, M., Matsushima, M., Yabe, I., Sato, N., Mori, M., and Sasaki, H. (2015). Epidemiology of Multiple System Atrophy in Hokkaido, the Northernmost Island of Japan. Cerebellum *14*, 682-687.

Sasaki, H., Emi, M., Iijima, H., Ito, N., Sato, H., Yabe, I., Kato, T., Utsumi, J., and Matsubara, K. (2011). Copy number loss of (src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (SHC2) gene: discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy. Mol Brain *4*, 24.

Savoiardo, M., Strada, L., Girotti, F., Zimmerman, R.A., Grisoli, M., Testa, D., and Petrillo, R. (1990). Olivopontocerebellar atrophy: MR diagnosis and relationship to multisystem atrophy. Radiology *174*, 693-696.

Schmitz-Hubsch, T., du Montcel, S.T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., Globas, C., Infante, J., Kang, J.S.*, et al.* (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. Neurology *66*, 1717-1720.

Scholz, S.W., Houlden, H., Schulte, C., Sharma, M., Li, A., Berg, D., Melchers, A., Paudel, R., Gibbs, J.R., Simon-Sanchez, J.*, et al.* (2009). SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. Ann Neurol *65*, 610-614.

Schuepbach, W.M., Rau, J., Knudsen, K., Volkmann, J., Krack, P., Timmermann, L., Halbig, T.D., Hesekamp, H., Navarro, S.M., Meier, N.*, et al.* (2013). Neurostimulation for

Parkinson's disease with early motor complications. N Engl J Med *368*, 610-622.
Schulz, J., Takousis, P., Wohlers, I., Itua, I.O.G., Dobricic, V., Rucker, G., Binder, H., Middleton, L., Ioannidis, J.P.A., Perneczky, R.*, et al.* (2019). Meta-analyses identify differentially expressed micrornas in Parkinson's disease. Ann Neurol *85*, 835-851.
Schulz, J.B., Klockgether, T., Petersen, D., Jauch, M., Muller-Schauenburg, W., Spieker, S., Voigt, K., and Dichgans, J. (1994). Multiple system atrophy: natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with 123IBZM-SPECT. J Neurol Neurosurg Psychiatry *57*, 1047-1056.
Takahashi, I., Hama, Y., Matsushima, M., Hirotani, M., Kano, T., Hohzen, H., Yabe, I., Utsumi, J., and Sasaki, H. (2015). Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. Mol Brain *8*.
Tan, X., Fu, Y., Chen, L., Lee, W., Lai, Y., Rezaei, K., Tabbara, S., Latham, P., Teal, C.B., Man, Y.G.*, et al.* (2016). miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer. Oncotarget *7*, 293-307.
Treiber, T., Treiber, N., and Meister, G. (2018). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nature Reviews Molecular Cell Biology *20*, 5-20.
Trojanowski, J.Q., Revesz, T., and Neuropathology Working Group on, M.S.A. (2007). Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. Neuropathol Appl Neurobiol *33*, 615-620.
Vallelunga, A., Ragusa, M., Di Mauro, S., Iannitti, T., Pilleri, M., Biundo, R., Weis, L., Di Pietro, C., De Iuliis, A., Nicoletti, A.*, et al.* (2014). Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy. Front Cell Neurosci *8*, 156.
Van Giau, V., and An, S.S. (2016). Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. J Neurol Sci *360*, 141-152.
Vejnar, C.E., and Zdobnov, E.M. (2012). MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength. Nucleic Acids Res *40*, 11673-11683.
Vistbakka, J., Elovaara, I., Lehtimaki, T., and Hagman, S. (2017). Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. Mult Scler *23*, 403-412.
Wang, J., Chen, J., and Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. J Cell Physiol *231*, 25-30.
Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.H., McClarty, S., Baxter, D., and Galas, D.J. (2012). Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. Plos One *7*.
Watanabe, H., Saito, Y., Terao, S., Ando, T., Kachi, T., Mukai, E., Aiba, I., Abe, Y., Tamakoshi, A., Doyu, M.*, et al.* (2002). Progression and prognosis in multiple system

atrophy: an analysis of 230 Japanese patients. Brain *125*, 1070-1083.
Wenning, G.K., Ben Shlomo, Y., Magalhaes, M., Daniel, S.E., and Quinn, N.P. (1994). Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. Brain *117 (Pt 4)*, 835-845.
Wenning, G.K., Tison, F., Ben Shlomo, Y., Daniel, S.E., and Quinn, N.P. (1997). Multiple system atrophy: a review of 203 pathologically proven cases. Mov Disord *12*, 133-147.
Wenning, G.K., Tison, F., Seppi, K., Sampaio, C., Diem, A., Yekhlef, F., Ghorayeb, I., Ory, F., Galitzky, M., Scaravilli, T.*, et al.* (2004). Development and validation of the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS). Mov Disord *19*, 1391-1402.
Wightman, B., Burglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P., and Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhabditis elegans development. Genes Dev *5*, 1813-1824.
Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell *75*, 855-862.
Yabe, I., Soma, H., Takei, A., Fujiki, N., Yanagihara, T., and Sasaki, H. (2006). MSA-C is the predominant clinical phenotype of MSA in Japan: analysis of 142 patients with probable MSA. J Neurol Sci *249*, 115-121.
Yang, X., Zhao, Q., An, R., Zheng, J., Tian, S., Chen, Y., and Xu, Y. (2016). Mutational scanning of the CHCHD2 gene in Han Chinese patients with Parkinson's disease and meta-analysis of the literature. Parkinsonism Relat Disord *29*, 42-46.
Zhang, L., Cao, B., Zou, Y., Wei, Q.Q., Ou, R., Liu, W., Zhao, B., Yang, J., Wu, Y., and Shang, H. (2018a). Causes of Death in Chinese Patients with Multiple System Atrophy. Aging Dis *9*, 102-108.
Zhang, X., Xin, G., and Sun, D. (2018b). Serum exosomal miR-328, miR-575, miR-134 and miR-671-5p as potential biomarkers for the diagnosis of Kawasaki disease and the prediction of therapeutic outcomes of intravenous immunoglobulin therapy. Exp Ther Med *16*, 2420-2432.