

多系統萎縮症における血漿microRNA発現量変化の検討

研究分担者 佐々木秀直¹⁾

研究協力者 上床 尚¹⁾, 浜 結香¹⁾, 高橋育子¹⁾, 松島理明¹⁾, 矢部一郎¹⁾, 内海 潤¹⁾

¹⁾ 北海道大学大学院医学研究院神経病態学分野 神経内科学教室

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)の病態を反映する分子バイオマーカー検索のため、血漿内 microRNA (miRNA)の発現量を microarray 法および quantitative polymerase chain reaction (qPCR)で検討した。Microarray 法では、健常コントロール群、MSA-C 群間での 1720 種の血漿中 miRNA 発現量を比較検討し、up-regulated miRNA 6 種、down-regulated miRNA 16 種を同定した。これらのうち 10 種の miRNA を qPCR で解析し、健常コントロール群、MSA-C 群、MSA-P 群、パーキンソン病(PD)群間で比較検討した。hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-24-3p の発現量がパーキンソン病群と比較して、MSA-C 群で低下しており、また、hsa-miR-A (名称未公表)が、MSA-P 群、PD 群と比較して MSA-C 群で発現が上昇していた。疾患群間で発現の異なる miRNA が複数同定され、疾患バイオマーカーになり得ることが示唆された。

A. 研究目的

MSA の診断もしくは病態を反映する分子バイオマーカーを検索するため、MSA 患者の血漿における microRNA (miRNA)発現量の変化を比較検討した。

B. 研究方法

Microarray 法、quantitative polymerase chain reaction (qPCR)法を用いて血漿中の miRNA 発現を検討した。Microarray 法では、3D-gene[®] Human miRNA oligo chips (ver. 17)を用い、健常コントロール、MSA-C 群の血漿を対象として、1720 種の miRNA の発現量を比較検討した。発現量を群間比較することによって、MSA 群で発現が上昇しているもの (up-regulated miRNA)、低下しているもの (down-regulated miRNA)を抽出した。

次に健常コントロール、MSA (MSA-C 群、MSA-P 群)、疾患コントロール群 (パーキンソン病群)を対象とし、microarray 法で同定された up-regulated miRNA、down-regulated miRNA のうち各 5 種の miRNA を qPCR で半定量的に測定し、群間比較をおこなった。qPCR では、血漿中より抽出した total RNA 1 ng を逆転写し、miScript[®] SYBR Green PCR

Kit を用いて qPCR を行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて対象 miRNA の発現量を群間比較した。

血液の提供においては、口頭に加えて文書で説明し、文書で同意を得た。本研究は医の倫理委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

Microarray 法では健常コントロール 6 例、MSA-C 症例 11 名を対象として解析を行った。979 種の miRNA が検出され、平均発現量が全 miRNA の中央値以上であった miRNA 489 種を抽出した。この中で student *t* 検定で MSA-C 群で有意に上昇していた miRNA 7 種、低下していた miRNA 120 種が同定された。これらの miRNA のうち、全ての検体で検出可能であったもの、発現量が高かったものを抽出し、up-regulated miRNA 6 種、down-regulated miRNA 16 種を同定した。

qPCR 法では健常コントロール、MSA-C 群、MSA-P 群、PD 群それぞれ 30 例を対象とし解析を行った。hsa-miR-371b-5p, hsa-miR-4708-3p, hsa-miR-1538, hsa-miR-4467m, hsa-miR-4513 は primer dimer 形成もしくは PCR 不良のため対象より除外した。血漿中 hsa-miR-19b-3p の発現量は、パーキンソン病群と比較して、MSA-C 群、MSA-P 群で優位に上昇していた。血漿中 hsa-miR-24-3p の発

現量が PD 群に比較し MSA-C 群で有意に低下していた。また、血漿中 hsa-miR-A (名称未公表)の発現量が、健常コントロール群、MSA-C 群に対して MSA-P 群、PD 群で有意に低下していた。また、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-4736 は群間で有意差が認められなかった。

D. 考察

本研究では複数の miRNA の発現量が、健常コントロール、MSA-C 群、MSA-P 群、パーキンソン病群で異なることが示された。

hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p は、MSA 患者の血清内、髄液内で発現が変動することが既に報告されており、血漿中でも変動を認めたことより、バイオマーカーとしての有用性や病態機序への関与の可能性があると考えられた。

hsa-miR-A の発現量が神経変性疾患で変動することはこれまで報告されておらず、新規の指標候補になり得ると考えられる。

E. 結論

本研究で同定された複数の miRNA によって MSA の病態解析や、MSA-P とパーキンソン病との鑑別診断を行うことができる可能性が示唆された。本検討では、健常コントロールと MSA-C 群で発現が異なる miRNA の同定に至っていない。さらに複数の miRNA について、qPCR 法による解析を継続している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 1) Uwatoko H, Hama Y, Takahashi I, Matsushima M, Kanoh H, Yabe I, Sasaki H: A search for plasma microRNAs as diagnostic biomarkers of multiple system atrophy.23rd World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sep16-21, 2017

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし