

## 多系統萎縮症・パーキンソン病における血漿microRNA発現量変化の検討

研究分担者 佐々木秀直<sup>1)</sup>

研究協力者 上床 尚<sup>1)</sup>, 浜 結香<sup>1)</sup>, 岩田育子<sup>1)</sup>, 松島理明<sup>1)</sup>, 矢部一郎<sup>1)</sup>, 内海 潤<sup>1)</sup>

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)の早期診断・正確な診断に有用な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 8 種、down-regulated miRNA 129 種が選定された。これらのうち 16 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 の発現量は、PD 群で他群と比較し有意に上昇しており、hsa-miR-24-3p は PD 群で MSA-C 群より有意に発現が上昇していた。hsa-miR-671-5p は健常コントロール群、MSA-C 群に対して MSA-P 群、PD 群で有意な低下を認めた。また、hsa-miR-19b-3p hsa-miR-24-3p の発現量には強い相関が認められ、共通の pathway をターゲットとしている可能性が考慮された。

これらの miRNA の他コホート、他サンプル内での変動、経時的变化、標的遺伝子などの更なる解析が望まれる。

### A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)とパーキンソン病(PD)はともに、 $\alpha$ -synucleinopathy に分類され、緩徐進行性のパーキンソニズム、自律神経障害を呈するなどの共通点もあり、病型によっては発症早期の鑑別診断は難しい場合がある。

MicroRNA (miRNA)は 22 塩基前後の低分子 1 本鎖 RNA で、mRNA に相補的に結合し、mRNA の分解促進や翻訳阻害を行うことによって、タンパク発現の post-transcriptional regulation に関与する。miRNA の発現量は悪性腫瘍、感染症、神経変性疾患など多種の疾患で変動することが知られており、有用なバイオマーカーの候補と考えられる。

本研究では、MSA 患者、パーキンソン病患者の血漿より抽出した miRNA の発現量を比較することによって、病態や症状を反映するバイオ

マーカーを検索した。

### B. 研究方法

MSA 患者、PD 患者、健常コントロールより抽出した血漿中の miRNA 発現量を、microarray 法と qPCR を用いて比較検討した。対象: 北海道大学病院、帯広厚生病院、釧路労災病院で診断された MSA 患者、PD 患者および健常コントロールを対象とした。MSA の診断は Gilman の診断基準に準じて行い、probable MSA の症例のみを対象とした。また、悪性腫瘍、感染症、膠原病、内分泌疾患、精神疾患は miRNA 発現量を変化させることが報告されていることから、これらの疾患を合併する症例は対象より除外した。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究院 医の倫理

委員会の承認を得た。患者及び健常対照者へ口頭に加えて文面で説明し、文書で同意を得た。

**Microarray 法:** 3D-gene® Human miRNA oligo chips (ver. 17)を用い、MSA 群 13 例、健常コントロール群 6 例の血漿を対象として、1720 種の miRNA の発現量を比較検討した。

**qPCR:** MSA-C 群 31 例、MSA-P 群 30 例、PD 群 28 例、健常コントロール群 28 例を対象とし(MSA-C 群、MSA-P 群)、疾患コントロール群を対象とし、microarray 法で選定された up-regulated miRNA および down-regulated miRNA の各 8 種の miRNA を qPCR で定量的に測定した。血漿中より抽出した total RNA 1ng を miScript® RT II kit (QIAGEN Inc.) で逆転写し、miScript® SYBR PCR kit (QIAGEN Inc.)を用いて qPCR を施行した。発現量比較には hsa-miR-4516 を内在性コントロールとした  $\Delta\Delta CT$  法を用いた。

**標的遺伝子、GO pathway 検索:** qPCR で発現量変化が認められた miRNA を対象とし、標的予測ツール miRmap (mirmap. ezlab. org)を用いて標的遺伝子を検出し、それらの遺伝子が関与する GO (Gene Ontology) pathway を MetaCore™ を用いて検索した。

### C. 研究結果

Microarray 法では健常コントロール群 6 例、MSA 群症例 13 例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。MSA 群で有意に上昇していた miRNA 8 種、低下していた miRNA 129 種が選定された (Student *t* 検定。  $P < 0.05$ )。

qPCR 法では MSA-C 群 28 例、MSA-P 群 30 例、PD 群 28 例、健常コントロール群 28 例を対象とした。また、測定対象の miRNA として microarray 法で選定された up-regulated miRNA 8 種(hsa-miR-371b-5p、hsa-miR-663、hsa-miR-887、hsa-miR-1469、hsa-miR-1538、hsa-miR-4467、hsa-miR-4708 -3p、hsa-miR-4736)、および down-regulated miRNA のうち 8 種 (hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR -671-5p、hsa-miR-920、

hsa-miR-1722-5p、hsa-miR-3622-5p、hsa-miR-4513)を選択した。

hsa-miR-19b-3p の発現量は、PD 群で他群と比較し有意に上昇しており、hsa-miR-24-3p は PD 群で MSA-C 群より有意に発現が上昇していた (図 1、2)。また、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量には強い相関を認めた(図 3)。

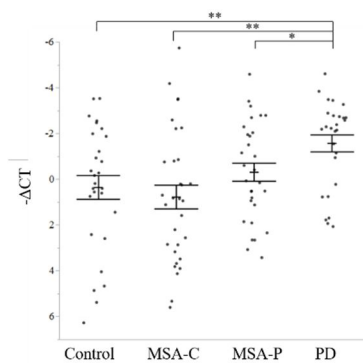


図 1 hsa-miR-19b-3p の発現比較

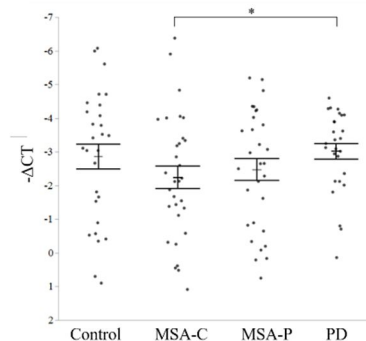


図 2 hsa-miR-24-3p の発現比較

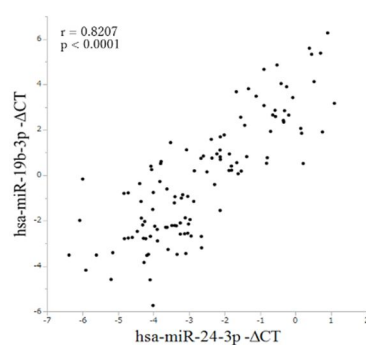


図 3。 hsa-miR-19b-3p , hsa-miR-24-3p の発現の相関

hsa-miR-671-5p は健常コントロール群、MSA-C 群に対して MSA-P 群、PD 群で有意な低下を認めた (図 4)。

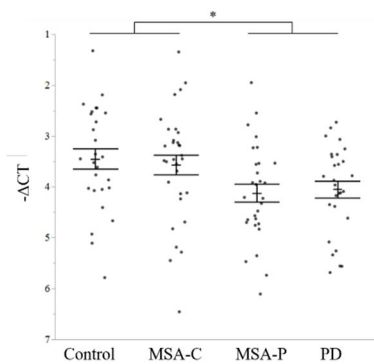


図 4 hsa-miR-671-5p 発現量の比較

これらの miRNA と性別、年齢、罹病期間、各種臨床スケール(UPDRS、UMSARS、SARA、Barthel Index、SCOPA-AUTO)には相関が認められなかった。また、対象の miRNA を昨年度より 6 種追加したが、これらには有意な発現量の差は認められなかった。

MetaCore™ による GO term 検索では、miRmap で予測された hsa-miR-671-5p の標的遺伝子が、神経発達や平滑筋収縮に関連した複数の GO process に関与することが示された(図 5)。また、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p の予測標的遺伝子に、ドパミン、カテコラミンのシナプス伝達や平滑筋収縮に関連する GO process が関与することが示唆された(図 6)。

#### D. 考察

本研究では血漿中の複数の 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、PD 患者および MSA 患者の血清と髄液で発現の変動することが既に報告されている。また、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の各発現量には強い相関が認められた。このことから、両者には共通の pathway に関与している可能性が考慮された。GO process 検索においてはドパミン・カテコラミンのシナプス伝達に関する pathway との関与が示唆された。複数のサンプルで発現変動が認められること、シナプス伝達などの GO process との関連が示唆されたことより、これらの miRNA は PD や MSA の病態や反映している可能性がある。

hsa-miR-671-5p の発現量が神経変性疾患で変動することは従来には報告されていない。また、qPCR を用いた解析で MSA-C、MSA-P 間で発現が異なる miRNA はこれまで報告されておらず、MSA-C、MSA-P の病態の違いや症状の違いを反映している可能性がある。

#### E. 結論

血漿中 miRNA の発現量解析により、PD 群、MSA-C 群、MSA-P 群で発現量に差が認められる miRNA を複数同定した。更なる症例の蓄積、他サンプルを用いた解析、経時的变化解析や同定された miRNA の標的遺伝子や機能解析が望まれる。

	GO 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

図 5 hsa-miR-671-5p との関連が示唆された GO process

	GO 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

図 6 hsa-miR-19b-5p, hsa-miR-24-3p との関連が示唆された GO process

#### F. 健康危険情報

該当なし

Neurology , Kyoto , Japan, Sep16-21 ,  
2017

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

投稿中。

##### 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. 23<sup>rd</sup> World Congress of

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得

該当なし

##### 2.実用新案登録

該当なし

##### 3.その他

該当なし