

多系統萎縮症におけるバイオマーカー探索研究
～歩行解析と miRNA 分析～

研究分担者 佐々木秀直
研究協力者 白井慎一、上床 尚、佐藤智香、浜 結香、岩田育子、松島理明、矢部一郎、
内海 潤
所属 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

多系統萎縮症の進行度評価において、進行度の変化を定量的に評価できる鋭敏な評価法の開発が、臨床試験に必要である。我々は、歩行解析と miRNA 分析をこの 3 年間施行した。

過去に我々、モーションレコーダーを用いて純粋小脳型脊髄小脳変性症の定量解析を開発し報告している。今回は、その測定法を用いて多系統萎縮症(MSA)患者を経時的評価した。起立・歩行機能は閉眼起立各 1 分間、30m 距離の 6 分間往復歩行により行なった。記録データの解析法は先の報告と同一である。歩行解析と同時に、重症度を、歩行距離と UMSARS でスコアリングした。MSA 患者 22 名で解析し、MSA-C、MSA-P 間の比較と 3 ヶ月ごとの経時変化を評価した。重症度スコアとの相関では、直進歩行時の上下平均振幅(VT)は UMSARS や歩行距離と有意な相関を認めた(UMSARS; $R = -0.7754$, $p = 0.0004$, 歩行距離 $R = 0.9035$, $p < 0.0001$)。歩行解析による測定値は、MSA の重症度と相関した。MSA-C 12 例と MSA-P 7 例を比較した。年齢、罹病期間は有意な差を認めなかったが、UMSARS は MSA-P の方が有意に高く(Ave 11.5 vs 15.0, $p = 0.0385$)、VT は MSA-P の方が有意に低かった(0.0161 vs 0.0120, $p = 0.0451$)。経時評価では 3 ヶ月時点で 8 名中 2 名が歩行不可となり、6 ヶ月時点で 5 名中 2 名が、9 ヶ月時点で 4 名中 2 名が脱落し、12 ヶ月時点で追跡している全員が 6 分間歩行不能となった。また、歩行不可能になるまでの期間を比較すると MSA-P、MSA-C で差を認めなかった。

また、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 解析(健常コントロール 6 例、MSA 症例 13 例)を施行し、MSA における up-regulated miRNA 8 種、down-regulated miRNA 129 種を同定した。これらの miRNA より up-regulated miRNAs 8 種、down-regulated miRNAs 8 種を選択し、RT-qPCR 法を用いた miRNA 発現量の比較定量を行った。RT-qPCR は MSA-C 28 例、MSA-P 30 例、PD 28 例、健常コントロール 28 例を対象として施行した。RT-qPCR では、hsa-miR-19b-3p の発現量が PD 群で他群と比べ有意に上昇しており、血漿中 hsa-miR-24-3p の発現量が PD 群で MSA-C 群より上昇していた。また、hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量には強い相関が見られ、共通の遺伝子やプロセスに関与している可能性が示唆された。さらに、hsa-miR-671-5p は MSA-P 群、PD 群で他群と比べ発現の有意な低下を認めた。Enrichment 解析を行い、これらの miRNA と関与のある GO process を検索したところ、hsa-miR-19b-3p および hsa-miR-24-3p がドパミン、カテコラミンのシナプス伝達や平滑筋収縮に関連すること、hsa-miR-671-5p が神経分化や神経発達に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

来る臨床試験のため、MSA のバイオマーカー開発は急務である。過去に我々、モーションレコーダーを用いて純粋小脳型脊髄小脳変性症の定量

解析を開発し報告している。今回は、その測定法を用いて多系統萎縮症(MSA)患者を経時的評価した。

また、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

1)歩行解析

歩行解析装置として三次元加速度計モーションレコーダー（見守りゲイト®、LSIメディエンス）を使用した。重心動揺の測定は開閉眼立位で各1分間と、6分間で30mの距離を反復歩行することで行った（6分間歩行）。加速度信号を2回積分して歩行運動の相対軌道を求めた。そして、立位時、直進時および方向転換（ターン）時における各方向の軌道振幅の平均値と変動係数（**coefficient of variation: CV**）を計算した。これらの指標と臨床症状の重症度{**UMSARS**および歩行距離}との相関を検討した。

対象は独歩可能な**MSA**患者とし初回評価の後、可能な患者は3ヶ月間隔で1年間にわたり定期的に進行度を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は北海道大学病院自主臨床研究として承認されており、対象者からは文書にて説明し同意を得た。

2)miRNA分析

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、

Ct法を用いて対象**miRNA**の発現量を群間比較した。

さらに**Enrichment**解析を行い、これらの**miRNA**と関与のある**GO process**を検索した

（倫理面への配慮）

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

1)歩行解析

加速度計の装着部位：予め身体各所に装着して検討した結果、失調性歩行の評価に最適なレコーダー装着部位は腰背部と胸背部であることを明らかにした。



図 1.加速度計の装着部位

次に測定部位の計測値を比較した。その結果、健常対照群の歩行解析では上下と右方向の変動係数は胸背部が、前後方向は腰背部での測定にばらつきが小さく、よりコントロールされていると考えられた。（図 1. Shirai S, et al. *J Neurol Sci* 2015 に発表）。

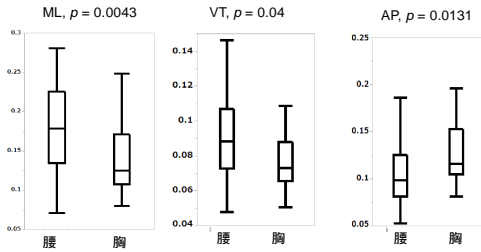


図 2.装着部位と加速度計測値

MSA 患者 22 名のうち、MSA-C が 12 名、MSA-P が 7 名、MSA 疑いが 3 名であった。男性 9 名、女性 13 名、年齢は 61.8 ± 10.1 (平均 \pm S.D. 以下同様)、罹病期間 2.3 ± 1.8 、UMSARS part II 12.2 ± 4.0 、歩行距離 329 ± 79.7 であった。

純粹小脳型 SCD においては直進歩行時の左右平均振幅がその重症度スケールである SARA と最もよく相関し、1.5 年で鋭敏性が SARA よりも高かった。しかしながら、MSA においてその重症度スケールである UMSARS part II にもっともよく相関したのは直進歩行時の上下平均振幅 VT であった。(図 3, $R = -0.8213$, $p = 0.0006$)

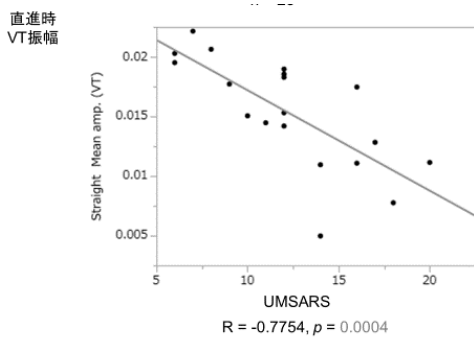


図 3 MSA 患者の VT と UMSARS の相関

また歩行距離とも有意な相関を認めた(図 4, $R = 0.9035$, $p < 0.0001$)

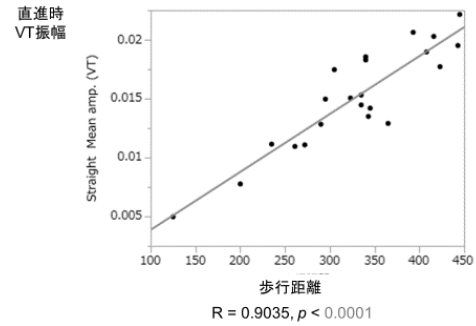


図 4 MSA 患者の VT と歩行距離の相関

また、MSA-C 12 名と MSA-P 7 名を比較した。それぞれの病型ごとのプロフィールは表 1 の通りである。

	MSA-C (n = 12)	MSA-P (n = 7)	p
Sex (M/F)	6/6	1/6	
発症年齢	59.8 ± 10.8	53.9 ± 16.9	0.59
罹病期間	1.8 ± 0.9	1.8 ± 1.1	0.71

Average \pm standard deviation

表 1 MSA-C 患者と MSA-P 患者のプロファイル

UMSARS 下位項目を表 2 のように分類し、て比較した。UMSARS は MSA-P の方が有意に高く (Ave 11.50 vs 15.00, $p = 0.0385$)、VT は MSA-P の方が有意に低かった (Ave 0.16 vs 0.12, $p = 0.0451$)。下位項目を比較すると Ataxia の要素では差はなく、パーキンソン症状の要素で MSA-P がより重症となっていた (表 3)。

Items of UMSARS part II	Pism①	ataxia①	Pism②	ataxia②	Pism③	ataxia③
表情						
言語						
眼球運動障害						
静止時振戦						
姿勢時振戦						
筋トーン						
手の反復拮抗運動						
手指タッピング						
下肢敏捷性						
踵膝屈試験						
椅子からの立ち上がり						
姿勢						
体幹動揺						
歩行						

表 2 UMSARS 下位項目

	MSAC (n=12)	MSAP (n=6)	p
Gait distance (m)	347 ± 68.4	277 ± 88.6	0.0335
UMSARS			
total	11.50 ± 3.5	15.0 ± 2.9	0.0385
PartII			
Pism①	8.3 ± 3.5	12.6 ± 3.5	0.0192
ataxia①	10.8 ± 2.8	11.6 ± 2.1	0.5558
Pism②	0.6 ± 0.9	3.4 ± 1.0	<.0001
ataxia②	3.25 ± 1.13	2.4 ± 1.0	0.1294
Pism③	4.3 ± 2.0	7.0 ± 2.8	0.0266
ataxia③	5.7 ± 1.8	6.6 ± 2.4	0.3629
The average amplitude of VT (straight)	0.0161 ± 0.0040	0.0120 ± 0.004	0.0451
The average amplitude of VT (turn)	0.0125 ± 0.0030	0.0080 ± 0.002	0.0122

Average ± standard deviation

表 3 MSA-C と MSA-P の比較

次に、3ヶ月ごとに経時変化を検討した。3ヶ月時点で8名中2名が歩行不可となり、6ヶ月時点で5名中2名が、9ヶ月時点で4名中2名が脱落し、12ヶ月時点で追跡している全員が6分間歩行不能となった(図5)。

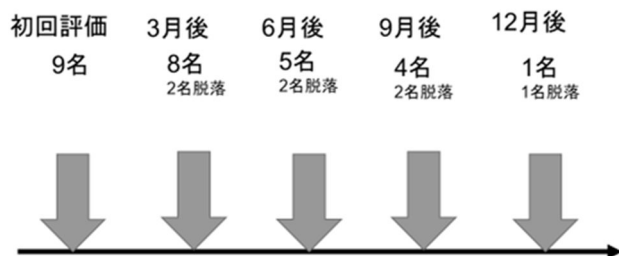


図 3 経時評価

歩行距離、UMSARS は経時的に悪化した(図5, 6)が、VT は Linear な悪化を認めなかった(図6)。

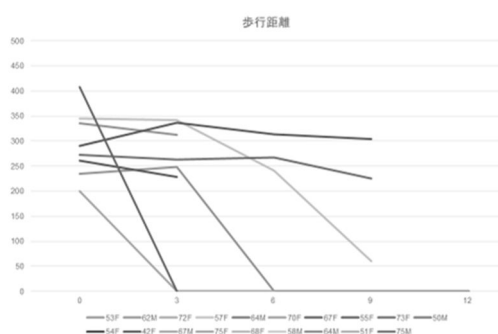


図 4 歩行距離の経時変化

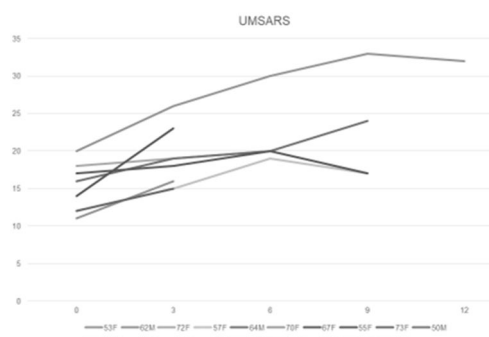


図 6 UMSARS の経時変化

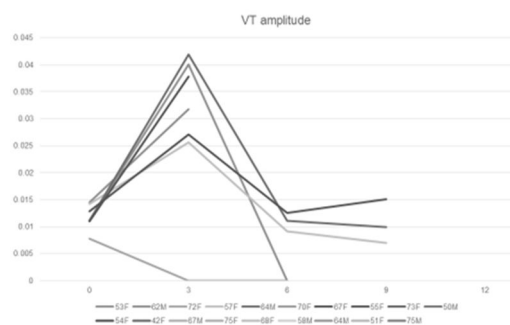


図 7 VT の経時変化

また、歩行不可能になるまでの期間を比較すると MSA-P, MSA-C で差を認めなかった。

2)miRNA 分析

Microarray 解析(健常コントロール 6 例、MSA 症例 13 例)を施行し、MSA における up-regulated miRNA 8 種、down-regulated miRNA 129 種を同定した。これらの miRNA より up-regulated miRNAs 8 種、down-regulated miRNAs 8 種を選択し、RT-qPCR 法を用いた miRNA 発現量の比較定量を行った。RT-qPCR は MSA-C 28 例、MSA-P 30 例、PD 28 例、健常コントロール 28 例を対象として施行した。RT-qPCR では、hsa-miR-19b-3p の発現量が PD 群で他群と比べ有意に上昇しており、血漿中 hsa-miR-24-3p の発現量が PD 群で MSA-C 群より上昇していた(図 8a,b)。

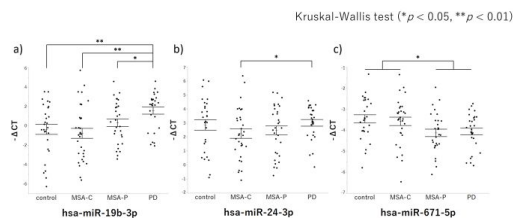


図 8 a) hsa-miR-19b-3p, b) hsa-miR-24-3p, c) hsa-miR-671-5p の健常コントロール、MSA-C、MSA-P、PD における比較

また、**hsa-miR-19b-3p** と **hsa-miR-24-3p** の発現量には強い相関が見られ、共通の遺伝子やプロセスに参与している可能性が示唆された(図 9)。

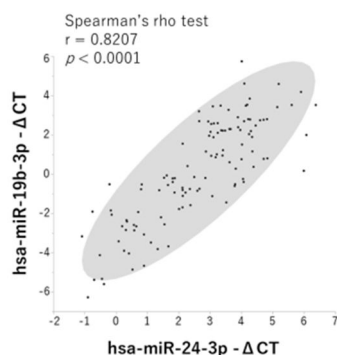


図 9 hsa-miR-19b-3p と hsa-miR-24-3p の発現量

さらに、**hsa-miR-671-5p** は **MSA-P** 群、**PD** 群で他群と比べ発現の有意な低下を認めた。(図 8c)

Enrichment 解析を行い、これらの **miRNA** と関与のある **GO process** を検索したところ、**hsa-miR-19b-3p** および **hsa-miR-24-3p** がドパミン、カテコラミンのシナプス伝達や平滑筋収縮に関連すること、**hsa-miR-671-5p** が神経分化や神経発達に参与している可能性が示された。

D. 考察

今回 **MSA** において純粋小脳型 **SCD** において有用性を報告した左右平均振幅ではなく **VT** が歩

行距離、**UMSARS** と非常に高い相関を示した。これはパーキンソン病でも純粋小脳型 **SCD** でも健康人に比べて低値を示すことを我々は報告している。これには二つ可能性がある。一つは、筋緊張の低下により、床の蹴り上げが低くなっている可能性がある。小脳性運動失調では測定障害や協調運動障害を呈することは良く知られているが、筋緊張も低下する。(Takakusaki K, et al. *J Neural Transm (Vienna)* 2016 123 695)

もう一つは、測定障害により左右の振幅が増してしまっており、その分上下の動きが減っている可能性を推測する。これには、患者の観察のみならず、ロボットなどによるシミュレーションが必要である。

今回、直進歩行時の **VT** は **Linear** な悪化を示さなかった。リハビリによる代償の他、歩行悪化について、パーキンソン症状や小脳性運動失調の他、錐体路徴候や自律神経症状などが影響している可能性がある。

また **miRNA** 分析では複数の **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-671-5p 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

- 1) 多系統萎縮症において歩行の定量的評価では上下方向の平均振幅が **UMSARS** や **6** 分間歩

行距離と有意に相関した。経時変化の追跡において、歩行解析測定値は **Linear** な悪化を示さず、歩行障害については小脳症状や錐体外路症状の他の要素も考慮する

- 2) 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。

F. 研究発表

1.論文発表

英文論文

- 1) Shirai S, Yabe I, Naganuma R, Sato C, Takahashi I, Matsushima M, Kano T, Sasaki H; Tremor during orthostatism as the initial symptom of Machado-Joseph disease. Clin Neurol Neurosurg 173:173-175, 2018
- 2) Yoshida K, Kuwabara S, Nakamura K, Abe R, Matsushima A, Beppu M, Yamanaka Y, Takahashi Y, Sasaki H, Mizusawa H; Research Group on Ataxic Disorders; Idiopathic cerebellar ataxia (IDCA): Diagnostic criteria and clinical analyses of 63 Japanese patients. J Neurol Sci 384:30-35, 2018
- 3) Shirai S, Yabe I, Takahashi-Iwata I, Matsushima M, Ito M Y, Takakusaki K, Sasaki H: The responsiveness of triaxial accelerometer measurement of gait ataxia is higher than that of the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia in the early stages of spinocerebellar ataxia. Cerebellum 18: 721-730, 2019
- 4) Uwatoko H, Hama Y, Takahashi-Iwata I, Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Utsumi J, Sasaki H: Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson ' s disease.

Mol. Brain. 12: 49, 2019

2.学会発表

全国学会

- 1) 白井慎一 . シンポジウム 運動失調性歩行の定量解析とその可能性- 第 35 回日本神経治療学会総会 . 2017 年 11 月 16 日-18 日 , 大宮
- 2) Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Sasaki H. Quantitative Evaluation of Multiple System Atrophy by Triaxial Accelerometers. 第 59 回日本神経学会学術大会. 2018 年 5 月 22 日-25 日
- 3) Sato C, Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Sasaki H. Quantitative evaluation of gait ataxia of Multiple System Atrophy patients. 第 60 回日本神経学会学術大会. 2019 年 5 月 22 日-25 日, 大阪

国際学会

- 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
- 2) Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Sasaki H: Quantitative evaluation of spinocerebellar degeneration by triaxial accelerometers and 9-hole peg test. 23rd World Congress of Neurology, Sep 16-21, 2017, Kyoto, Japan
- 3) Shirai S, Yabe I, Matsushima M, Ito Y, Yoneyama M, Sasaki H: Quantitative evaluation of gait ataxia by triaxial accelerometers is more sensitive than SARA within 1.5 Years. 21st International Congress of Parkinson ' s Disease and

Movement Disorders, Jun4-7, 2017, Vancouver, Canada

- 4) Shirai S, Yabe I, Matsushima M, Ito Y, Yoneyama M, Sasaki H. A comparison of relative displacement by double integration with root mean square in the quantitative evaluation of gait ataxia by triaxial accelerometers. 22nd International Congress of Parkinson ' s Disease and Movement Disorders, Oct 5-9, 2019, Hong Kong, China
- 5) Sato C, Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Sasaki H. Quantitative evaluation of gait

ataxia of Multiple System Atrophy patients. 23rd International Congress of Parkinson ' s Disease and Movement Disorders, Sept 22-26, 2019, Nice, France

G. 知的財産の出願・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