

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	原 範和
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1810 号
学位授与の日付	令和元年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease (アルツハイマー病の進行に関連する血清マイクロ RNA バイオマーカー miR-501-3p)
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 博中 副査 准教授 清水 宏 副査 准教授 金澤 雅人

博士論文の要旨

【背景と目的】

マイクロ RNA は、血清や血漿といった体液中において比較的安定した状態で存在しているため定量測定が可能である。そのためマイクロ RNA は、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) に代表される神経変性疾患の血液バイオマーカーの候補として期待されている。本研究は、AD の診断や病態を反映するバイオマーカーとなりうる血液中マイクロ RNA を同定することを目的に、AD の病理ステージに着目して血清中マイクロ RNA 量を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。

【方法】

本研究は、2つのサンプルセットを用いた解析を行った。病理サンプルセットは、神経病理学的に診断された AD 患者 27 名および対照者 18 名で構成される。死亡前 2 週間以内に被験者より採取された血清および剖検時に採取された側頭葉皮質組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてマイクロ RNA の発現量を網羅的に解析した。臨床サンプルセットは、National Institute of Neurological and Communicative Disease and the Stoke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association 基準により臨床的に診断された AD 患者 36 名および認知機能正常者 22 名で構成される。被験者より採取された血清から RNA を抽出し、定量 PCR によりマイクロ RNA 量を定量した。また、ヒト神経芽細胞腫株 SH-SY5Y に特定のマイクロ RNA を遺伝子導入により過剰発現させた。24 時間後に細胞を回収し RNA を抽出した。抽出した RNA を次世代シーケンサーにより解析し、マイクロ RNA の導入によって発現変動する遺伝子を同定した。

【結果】

次世代シーケンサーを用いて病理サンプルセット由来の血清を解析した結果、3つのマイクロ RNA: hsa-miR-501-3p ($P<0.01$), hsa-let-7f-5p ($P<0.05$), hsa-miR-26b-5p ($P<0.05$) が AD 群と対照群との間で有意に変動していた。これら 3つの候補マイクロ RNA について、臨床サンプルセットの血清を用いて定量 PCR により検証した。その結果、hsa-miR-501-3p は臨床サンプルセットにおいても有意に発現変動していた。

($P<0.01$, 感度 53%, 特異度 100%, area under the curve = 0.82). 血清中の hsa-miR-501-3p 量は AD 患者群で有意に減少しており, その減少は認知機能評価の指標である Mini-Mental State Examination スコア低下と有意に相関していた ($r=0.375, P<0.01$). さらに, hsa-miR-501-3p が同一被験者の脳内においても変動しているか否かを明らかにするため, 病理サンプルセットの剖検脳組織における hsa-miR-501-3p 量を次世代シーケンサーにより解析した. 血清中での減少とは逆に, 脳内では hsa-miR-501-3p の発現量は著しく増加しており ($P<0.01$), その発現量は AD 病理の進行を表す Braak 神経原線維変化ステージと有意に相関していた ($r=0.436, P<0.01$). AD 脳における hsa-miR-501-3p 増加の遺伝子発現への影響を調べるため, 培養細胞 SH-SY5Y に hsa-miR-501-3p を過剰発現させたところ, 128 個の遺伝子の発現量が有意に減少した. これら変動を認めた遺伝子は DNA 複製や細胞周期といった生体内作用に関連していた.

【考察】

本研究の結果より, hsa-miR-501-3p は AD の病理ステージの進行に伴って血清中で変動すること, そして血清中での変動は同一被験者の脳内での発現変動と相関していることが示された. このことから, hsa-miR-501-3p は脳内における AD 病態を反映する新規の血液バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された. hsa-miR-501-3p についての研究は少なく, その機能や生体内での作用はほとんどわかっていない. 今回行った培養細胞を用いた強制発現実験の結果からは, hsa-miR-501-3p は神経細胞における細胞周期の異常に関与している可能性が考えられた. 有糸分裂後の神経細胞における細胞周期の異常は, アポトーシスによる細胞死を引き起こし, AD 脳における初期イベントに関連することが既報の研究により指摘されている. 別機序の可能性としては, 神経細胞の樹状突起において AMPA 受容体サブユニット GluA1 の活動依存的な発現調節を miR-501-3p が媒介していることを実証した研究があり, miR-501-3p は記憶や学習などの認知機能に関わるシナプスの可塑性に影響を与えたことも考えられる. しかしながら, hsa-miR-501-3p が AD 病理に与える影響については不明な点が多く残されており, 今後更なる解析が必要である.

審査結果の要旨

本研究は, AD の診断や病態を反映するバイオマーカーとなりうる血液中マイクロ RNA(miRNA)を同定することを目的に, AD の病理ステージに着目して血清中 miRNA 量を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析したものである.

研究はまず神経病理学的に診断された AD 患者 27 名および対照者 18 名で構成される. 死亡前 2 週間以内に被験者より採取された血清および剖検時に採取された側頭葉皮質組織から抽出された病理サンプルセットで, 有意に変動する 3 つの mRNA、即ち 3 つのマイクロ RNA: hsa-miR-501-3p ($P<0.01$), hsa-let-7f-5p ($P<0.05$), hsa-miR-26b-5p ($P<0.05$) を同定し, これら 3 つの候補マイクロ RNA について, 臨床的に診断された AD 患者 36 名および認知機能正常者 22 名で構成される臨床サンプルセットの血清を用いて定量 PCR により検証した. その結果, hsa-miR-501-3p は臨床サンプルセットにおいても有意に発現変動していた ($P<0.01$, 感度 53%, 特異度 100%, area under the curve = 0.82). 血清中の hsa-miR-501-3p 量は AD 患者群で有意に減少しており, その減少は認知機能評価の指標である Mini-Mental State Examination スコア低下と有意に相関していた ($r=0.375, P<0.01$).

本研究の結果より, hsa-miR-501-3p は AD の病理ステージの進行に伴って血清中で変動すること, そして血清中での変動は同一被験者の脳内での発現変動と相関していることが示された. このことから,

hsa-miR-501-3p は脳内における AD 病態を反映する新規の血液バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。これらの結果は今後の臨床診断へ寄与すること大である。このため博士課程論文として妥当であると判断した。