

α -シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成時に誘導される ヒトグリア細胞由来エクソソーム内マイクロRNAの同定

笠原 壮

新潟大学大学院医歯学総合研究科

神経内科学分野

(指導：小野寺 理教授)

Identification of miRNAs in Exosomes from Human Glial Hybrid Cell Line with Cytoplasmic Alpha-synuclein Inclusions

Sou KASAHARA

Department of Neurology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

要 旨

近年、多系統萎縮症 (multiple system atrophy; MSA) の診断バイオマーカーとして、患者血液や脳脊髄液中のマイクロRNA (micro RNA; miRNA) が報告されている。しかし、早期診断の為に、罹患細胞の細胞死による副次的な変化を除外する必要がある。そこで、罹患細胞が細胞死に至る前の病態を反映した miRNA を解析する試料として、エクソソーム (exosome) に着目した。エクソソームは、細胞外小胞 (small extracellular vesicle; sEV) の 1 種であり、内部の物質は分泌細胞の環境を反映する。MSA では、主にオリゴデンドロサイトにて α シヌクレイン陽性の細胞質内封入体を認めることから、まず、この病態を反映する細胞モデルを作成し、その細胞由来のエクソソーム内に特徴的な miRNA が存在するか否かを検証することを目的とした。

ヒトオリゴデンドロサイト系培養細胞において、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋白を共導入し、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を形成した。その際の細胞培養培地から、超遠心法を用いてエクソソームを含む sEV 分画を分離した。 α シヌクレイン陽性封入体形成の有無の 2 群において、sEV 分画から抽出したエクソソーム RNA について、マイクロアレイにより、2,578 種類の miRNA の発現量を解析した。両群のいずれかで発現を認めた miRNA は 1,036 種類あり、両群間で発現量に統計学的有意差を認めた miRNA は 117 種類であった。これらを用い階層クラスター分析を行ったところ、 α シヌクレイン陽性封入体形成の有無に分類できた。また、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成時に、2 倍以上の発現変化を認めた miRNA は 29 種類あり、28 種類が増加、1 種類が減少していた。この内、MSA 患者体液中で発現変化が報告されており、挙動が一致していたのは、発現が増加した hsa-miR-663a

Reprint requests to: Sou KASAHARA
Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科

笠原 壮

のみであった。さらに、MSA患者において発現が低下する gamma aminobutyric acid A receptor associated protein に対する miRNA 2種類をはじめ、オートファジー障害や α シヌクレインのミスフォールディングとの関与が示唆される miRNA の増加など、MSA 病態の解明につながる可能性のある miRNA の変化を見出した。

本研究では、ヒトオリゴデンドロサイト系培養細胞において、 α シヌクレイン陽性細胞内封入体形成時に、エクソソーム内に特異的な miRNA 発現プロファイルがあることを見出した。この変化は、今後、ヒト患者組織や体液検体にて検証する必要がある。また、本研究において確立したエクソソームの分離およびエクソソーム RNA の抽出手技は、様々な検体に応用が可能であり、MSA 以外の神経変性疾患も対象とする。この手技を用い、疾患特異的な診断バイオマーカーの開発や病態解明を進めていくことが期待される。

キーワード：多系統萎縮症、 α シヌクレイン、エクソソーム、マイクロ RNA、バイオマーカー

緒 言

多系統萎縮症 (multiple system atrophy ; MSA) は、中年期以降に発症し、小脳性運動失調、パーキンソニズム、自律神経障害を主徴とする孤発性の神経変性疾患である¹⁾。発症後 6-8 年程度で臥床状態となり、突然死を来すこともある予後不良の疾患である²⁾。有効な治療法はなく、治療法の確立が課題である。神経変性疾患の治療としては、変性した組織の再生は困難であり、進行を妨げる治療方法が期待される。このような治療薬の治験の成功には、早期診断に寄与する、または神経変性の進行を鋭敏に捉えるバイオマーカーの開発が不可欠である。

診断バイオマーカーとして、近年、マイクロ RNA (micro RNA ; miRNA) が注目されている。miRNA は 20-25 塩基程度のノンコーディング RNA であり、遺伝子の転写後発現調節に関わっている。miRNA は細胞内外の環境変化に応じて変化し、組織、細胞毎に異なることから、診断バイオマーカーとして研究が進められており³⁾、特にがんの早期診断において実用化されている⁴⁾。

MSA でも患者血清や脳脊髄液中の miRNA に注目した研究が報告されている⁵⁾⁻⁸⁾。実際、MSA と、パーキンソニズムを来す進行性核上性麻痺やパーキンソン病との間において miRNA の発現の違いが報告されている⁵⁾⁸⁾⁹⁾。しかし、バイオマーカーの既報では、血清や脳脊髄液などの

cell-free RNA と呼ばれる RNA 中の miRNA を評価している。Cell-free RNA は罹患細胞の崩壊などの結果放出された副次的な変化である可能性があり、早期診断には適していない。よって、早期診断の為には、罹患細胞が細胞死にいたる前に、その病態を直接的に反映した試料で miRNA 変化を解析する事が望ましい。

著者は、罹患細胞の細胞内環境を反映する試料として、エクソソーム (exosome) に着目した。エクソソームは、直径約 100nm の細胞外小胞 (small extracellular vesicles ; sEV) のひとつで、ほぼすべての細胞が分泌する¹⁰⁾ (図 1 A)。また、エクソソームはドナー細胞由来の、膜蛋白、細胞内蛋白、DNA、mRNA、miRNA などを含有し、ドナー細胞の細胞内環境を反映している (図 1 B)。このことから、miRNA を含むエクソソーム含有物質は、がんや自己免疫性疾患などの診断バイオマーカーとして注目されている⁴⁾¹¹⁾。著者は、MSA でも、脳脊髄液や血液中のエクソソームを解析することにより、低侵襲的に、罹患細胞の細胞内環境を知ることが出来ると考えた。

MSA では、主にオリゴデンドロサイトに α シヌクレイン陽性の細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusion ; GCI) を認める¹²⁾。著者は、この状態で変化するオリゴデンドロサイト内の miRNA が、MSA の病態を反映したバイオマーカーとなる可能性があると考えた。さらに患者で低侵襲的にこれを解析するためには、エクソソーム内の miRNA

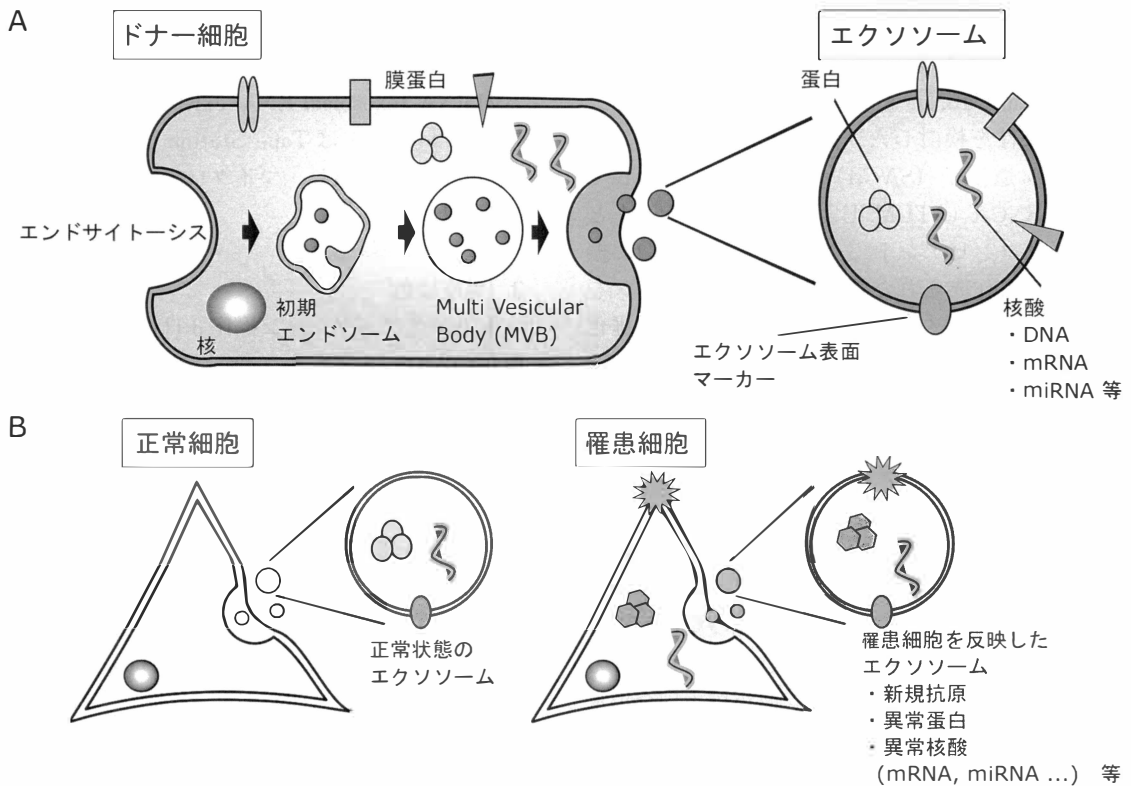


図1 エクソソームの特性 (模式図)

(A) エクソソームの合成経路. ドナー細胞の膜蛋白を巻き込んだエンドサイトーシスにより, 初期エンドソームが形成され, エンドソーム膜が内側にくびれて腔内小胞が形成される. やがて, 腔内小胞を多数含む多胞体 (multivesicular body : MVB) が形成され, このMVBがドナー細胞膜と融合し, 細胞外に分泌された腔内小胞がエクソソームである.

(B) エクソソームの診断バイオマーカーとしての可能性. エクソソームの合成経路から, ドナー細胞に由来する膜蛋白, 細胞内蛋白や各種核酸を含む. そのため, 罹患細胞に由来するエクソソームには, 疾患を反映した新規抗原や病的蛋白, 発現プロファイルの変化した核酸が含まれる.

の解析が有用と考えた. 本仮説を検証するために, 本研究では, まずエクソソーム内にMSA病態に応じた特異的なmiRNA発現プロファイルが存在するか否かを, 細胞モデル系で検証することを目的とした. 具体的には, α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を形成したヒトオリゴデンドロサイト系培養細胞由来のエクソソーム内のmiRNA発現プロファイルを検討した.

材料と方法

1. 培養細胞

ヒトグリア (オリゴデンドロサイト) 初代培養細胞とヒト横紋筋肉腫のハイブリッド細胞株であるMO3.13細胞 (CELLutions Biosystems Inc, Canada) を使用した. 細胞培養は, エクソソーム除去済の10%ウシ胎仔血清 (SYSTEM BIOSCIENCES, USA) を添加した, L-グルタミン, ピルビン酸ナトリウム含有ダルベッコ改変

イーグル培地 (Fujifilm, Japan) で行った。

α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成は、 α シヌクレイン凝集アッセイキット (Cosmo-Bio, Japan, Cat.No. SYN01) を用いて、既報¹³⁾に従い条件を検討した。同キットより、 α シヌクレイン遺伝子 (SNCA) 発現ベクターとして pCMV-SNCA (ATUM, USA) と、凝集シードとして、リコンビナント α シヌクレイン蛋白に振盪を加えて作成された線維化 α シヌクレインを用いた。これらを組み合わせ、未処理、線維化 α シヌクレイン (終濃度 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレインの共導入の、4つの条件によるトランスフェクション操作を加えた MO3.13 細胞を作成した。

トランスフェクション後、3日間 MO3.13 細胞を培養した培養上清をエクソソームサンプル用に回収した。また MO3.13 細胞は、免疫染色および免疫プロット用に回収した。MO3.13 細胞からの蛋白回収のため、100 μl のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline : PBS) で再懸濁し、等量の 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有試料用緩衝液 ($\times 2$) (Fujifilm, Japan) で溶解した。この試料を 5 分間煮沸し、細胞ライセイト免疫プロットサンプルとした。

2. エクソソームの分離、及び免疫プロットサンプル調製, RNA 抽出

エクソソームを含む sEV の分離は、超遠心法により行った。最初に、回収した細胞培養培地を 2,000g, 10 分の疎遠心を行い、細胞成分が含まれない上清のみを回収した。次に、Ultrafree-MC, GV 0.22 μm (Merck Millipore, USA) を用い 0.22 μm のフィルター濾過を行い、微細な細胞片を除去した。この上清を、Exocap-Ultracentrifuge/Storage Booster (MBL, Japan) を使用して、100,000g, 70 分の超遠心を 2 回を行い、sEV を分離した。200 μl の細胞培養培地に由来する sEV を 20 μl の PBS で再懸濁し、等量の 2% SDS 含有試料用緩衝液 ($\times 2$) で溶解した。この試料を 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間煮沸し、エクソソーム免疫プロット

サンプルとした。また、sEV の一部を電子顕微鏡で観察した。さらに、同 sEV から、miRNeasy micro kit (QIAGEN, USA) を用いてエクソソーム内 RNA (exosomal RNA : exRNA) を抽出した。抽出した exRNA は Tape Station 2200 (Agilent, USA) により定量し、マイクロアレイによる解析に使用した。

3. 免疫染色

トランスフェクション操作 3 日後、培養上清回収後の MO3.13 細胞を、4% パラホルムアルデヒドにて 15 分間固定した。0.2% Triton X-100 により 15 分間の透過処理を行った後、1% ヒツジ血清にて 1 時間のブロッキングを行った。一次抗体として α シヌクレインの C 末端である 131 番目から 140 番目のアミノ酸を認識するラビットポリクローナル抗 α シヌクレイン抗体 (Cosmo-Bio, Japan, Cat. No. TIP-SN-P09, 500 倍希釈) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 時間反応した。0.2% Tween 20 を含む PBS で 2 回 15 分間洗浄した後、二次抗体として抗ラビット Alexa Fluor Plus 488 (Thermo Fisher Scientific, USA, Cat. No. A32731, 500 倍希釈) を用いて 1 時間インキュベートした。再度洗浄の後、倒立型顕微鏡 IX83 (OLYMPUS, Japan) により観察した。

4. 免疫プロット解析

細胞ライセイト、およびエクソソーム免疫プロットサンプルは 1 ウェルあたり 5 μL をアプライし、Tris-glycine SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。

細胞ライセイト免疫プロットでは、 α シヌクレイン蛋白の検出を高めるために、既報¹⁴⁾に従って、転写後の PVDF 膜を 0.4% パラホルムアルデヒドにて 1 時間固定した。その後、一次抗体として、 α シヌクレインの 131 番目から 140 番目のアミノ酸を認識するラビットポリクローナル抗 α シヌクレイン抗体 (Cosmo-Bio, Japan, Cat. No. TIP-SN-P09, 1,000 倍希釈)、129 番目のセリン残基がリン酸化された α シヌクレイン蛋白

を認識するマウスモノクローナル抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (Fujifilm, Japan, Cat. No. 015-25191, 1000 倍希釈) を用いて4°Cで15時間反応させた。ローディングコントロールとしてマウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体 (Proteintech group, USA, Cat. No. 60004-1-Ig, 10,000 倍希釈) を用いた。

エクソソーム免疫プロットは、エクソソーム表面マーカーとしてマウスモノクローナル抗 CD9 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX001-3, 20,000 倍希釈), マウスモノクローナル抗 CD63 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX002-3, 5,000 倍希釈), マウスモノクローナル抗 CD81 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX003-3, 5,000 倍希釈), エクソソーム陰性マーカーとしてラビットモノクローナル抗カルネキシン抗体 (abcam, UK, ab92573, 10,000 倍希釈) を用いた。一次抗体は4°Cで15時間反応させた。

いずれの免疫プロットにおいても、一次抗体反応後、0.1% tween20 を含む PBS で洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスもしくは抗ラビット二次抗体を室温で1時間反応させた。イモビロンウェスタン化学発光 HRP 基質 (Merck Millipore, USA) にて得られたバンドシグナルを、Amersham Imager 680 (GE healthcare, USA) を用いて検出・数値化した。

5. 電子顕微鏡観察

エクソソームの形態学的評価のため、電子顕微鏡による観察を行った。sEV を4% PFA により固定し、コロジオン貼付グリッド上に吸着した。エクソソーム表面マーカーについて、マウスモノクローナル抗 CD9 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX001-3, 100 倍希釈), マウスモノクローナル抗 CD63 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX002-3, 100 倍希釈), マウスモノクローナル抗 CD81 抗体 (MBL, Japan, Cat. No. MEX003-3, 100 倍希釈), および15nm 金コロイド粒子標識抗マウス抗体 (BBI solutions, UK, 100 倍希釈) を用いて、3種類の標識を行った。それぞれ透過型電子顕微鏡 HT7700 (Hitachi, Japan) を用いて、加速

電圧75kVにより観察した。

6. RNA 発現解析

各々5回独立した系で導入を行い、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレインを共導入した MO3.13 細胞と、 α シヌクレイン遺伝子のみを導入した MO3.13 細胞から、細胞培養培地を回収した。1検体あたり計10mlの培養培地を処理して得られた exRNA をトータル RNA 量で各180ng 用意した。これを α シヌクレイン陽性封入体形成の有無による2群として、FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて RNA 検体のラベリングを行い、GeneChip™ miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific, USA) により miRNA の発現解析を実施した。

7. 統計解析

免疫プロットによる蛋白発現量についての統計解析には、EZR version 1.41 (The R Foundation for Statistical Computing) を使用し¹⁵⁾、各群の蛋白量は one-way ANOVA で比較し、post-hoc 解析は Turkey で行った。miRNA 発現の統計解析は、Transcriptome Analysis Console (TAC) ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific, USA) を用い、両群の miRNA 発現は、one-way ANOVA で比較した。miRNA の個別の標的 RNA の検索は、TargetScanHuman7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) を用いた。いずれの統計も、 $p < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

結 果

α -シヌクレイン陽性封入体の形成

ヒトグリア系培養細胞である MO3.13 細胞にて、 α シヌクレイン陽性封入体の形成を試みた¹³⁾。抗 α シヌクレイン抗体による免疫染色にて細胞質内封入体形成の有無を、蛍光顕微鏡を用いて目視にて検討した。線維化 α シヌクレインの導入のみでは α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成は認めなかった。しかし、 α シヌクレイン遺伝子導入に

て α シヌクレイン陽性の細胞質内封入体を認めた (図 2 A)。さらに α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋白を同時に導入した細胞では、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を、より明瞭に認めた (図 2 A)。封入体形成 α シヌクレインはリン酸化するため、リン酸化 α シヌクレインの定量により α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成率を比較検討した。 α シヌクレ

イン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋白を同時に導入した細胞で、リン酸化 α シヌクレインは著明に増加した (図 2 B, C)。同条件下では α シヌクレイン蛋白の増加も認めた (図 2 B, C)

細胞培養培地からのエクソソームの分離

培養培地から、超遠心法で回収した sEV 分画に、エクソソームが含まれているか検討した¹⁶⁾。

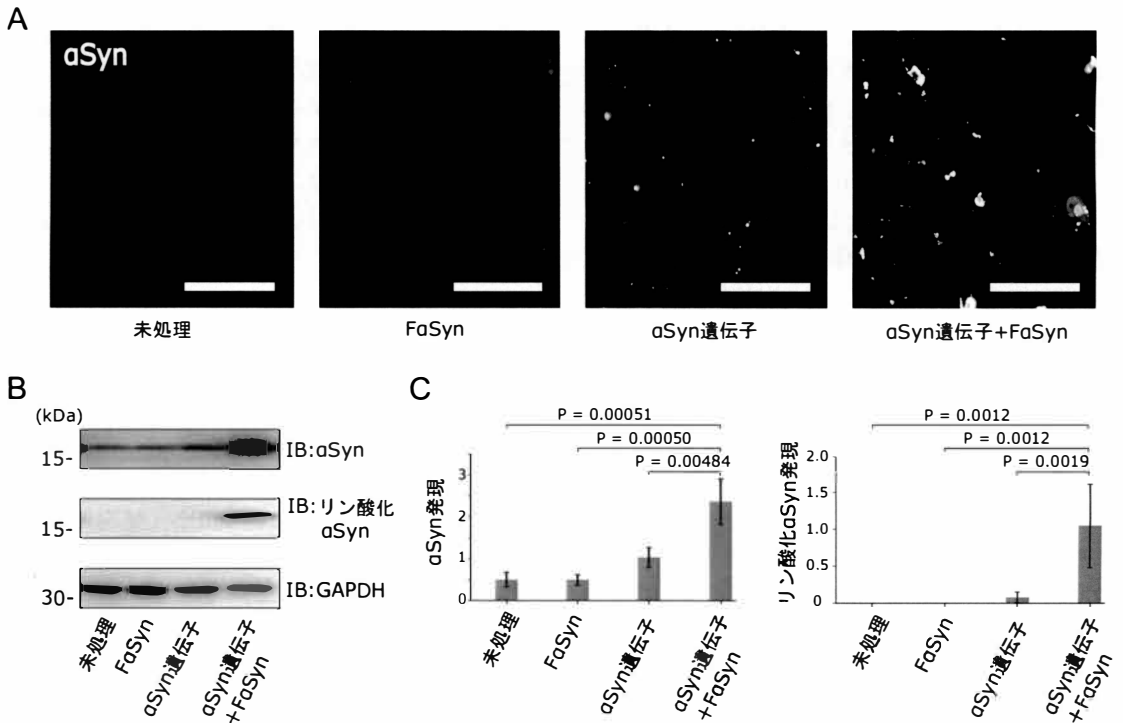


図 2 α シヌクレイン発現評価

未処理、線維化 α シヌクレイン蛋白のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋白の共導入の4種類の条件によるトランスフェクション操作を行った MO3.13 細胞についての蛋白発現。 α Syn (α -Synuclein; α シヌクレイン)、F α Syn (Febrile α Syn; 線維化 α シヌクレイン蛋白)

(A) 各操作3日後の MO3.13 細胞の免疫染色。未処理および線維化 α シヌクレインのみ導入の MO3.13 細胞では明らかな封入体形成は認められなかった。 α シヌクレイン遺伝子のみ導入でわずかに封入体は認められたが、線維化 α シヌクレインを共導入すると、より明瞭な封入体形成を来した。Bar = 100 μ m。

(B) 各操作3日間後の細胞ライセートの免疫プロット。 α シヌクレインは未処理の MO3.13 細胞でも検出されたが、線維化 α シヌクレインのみ導入では発現増加は認めなかった。 α シヌクレイン遺伝子のみ導入した場合には発現増加を認め、さらに、線維化 α シヌクレインを共導入した場合に、 α シヌクレインの発現はさらに増加した。リン酸化 α シヌクレインは、未処理および線維化 α シヌクレインのみ導入の MO3.13 細胞では検出されず、 α シヌクレイン遺伝子のみ導入ではわずかに検出された。さらに線維化 α シヌクレインを共導入すると発現が増加した。

(C) 免疫プロットデータの半定量解析。各シグナル値を GAPDH のシグナル値で除したものを解析に用いた。 α シヌクレイン、リン酸化 α シヌクレインともに、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレインを共導入した場合に、その他の操作と比較して、統計学的有意な発現増加を認めた。その他操作間で発現の統計学的有意差は認めなかった。データは平均 \pm 標準誤差で示す。N=3。

まず、エクソソーム表面マーカーである CD9, CD63, CD81 を対象とした免疫プロットにより評価した。条件として未処理、線維化 α シヌクレイン蛋白のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子のみ導入、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレインの共導入という、4 種類で sEV を分離

し比較した。いずれの条件においても CD9, CD63, CD81 を認め、エクソソーム収量に統計学的有意差は認めなかった (図 3 A, B)。一方、エクソソーム陰性マーカーであるカルネキシンは認めなかった。最後に免疫電子顕微鏡法による確認を行った。エクソソーム表面マーカーである

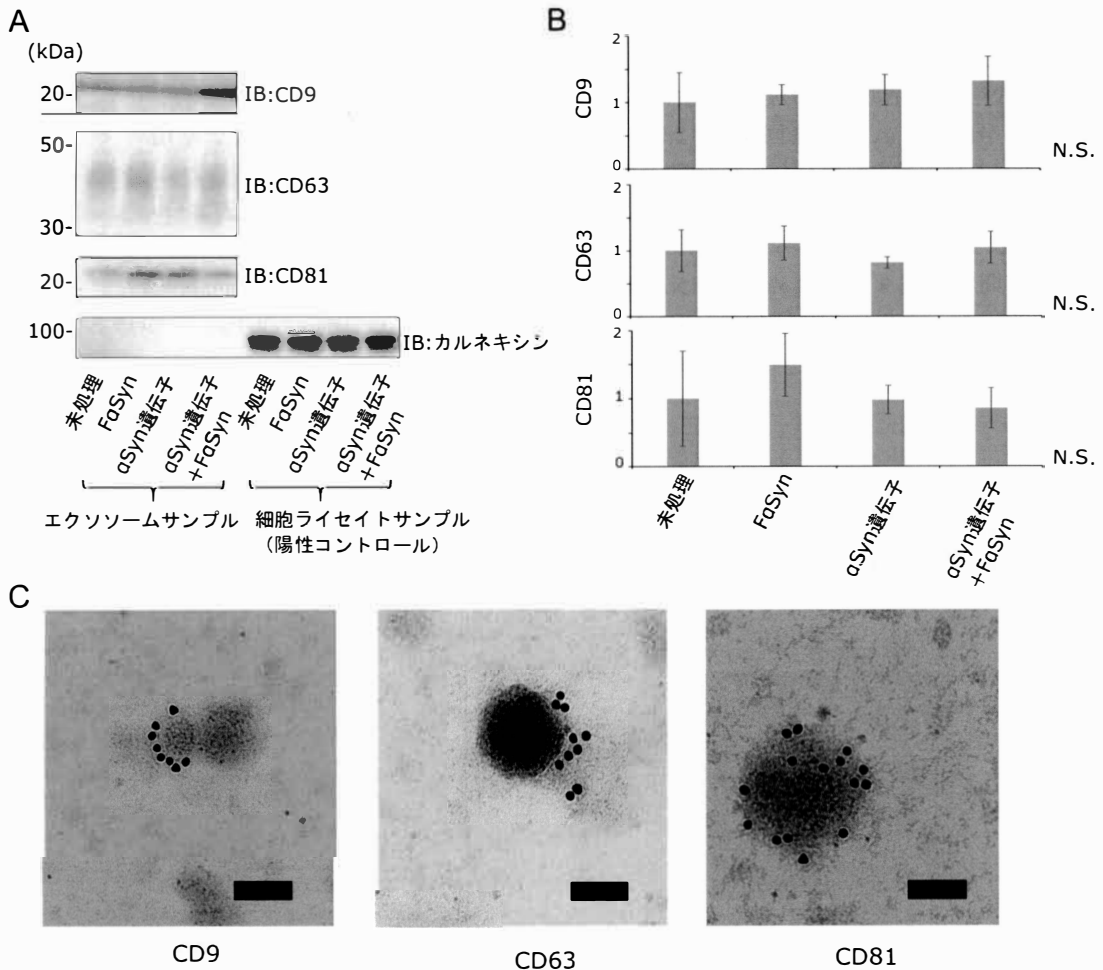


図3 エクソソーム回収評価

4 種類のトランスフェクション操作後の MO3.13 細胞の培養上清から分離した sEV 分画中のエクソソームの評価。

(A) sEV 分画から調製したエクソソームサンプルに対する免疫プロット。エクソソーム表面マーカーである CD9, CD63, CD81 は検出され、一方、陰性マーカーであるカルネキシンは検出できなかった。カルネキシン発現の陽性コントロールとして使用した細胞ライセイトではカルネキシンについて、バンドが検出された。

(B) 免疫プロットデータの半定量解析。未処理の場合のシグナル値との相対値で評価した。4 種類のトランスフェクション操作のいずれにおいても、蛋白発現量に統計学的有意差は認めなかった。データは平均 \pm 標準誤差で示す。N=3. N.S. = No Significance.

(C) sEV 分画の電子顕微鏡像。抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体、抗 CD81 抗体および金コロイド (画像での黒い点) で標識される、径約 100nm 前後の膜を有する小胞構造が確認された。Bar = 100nm.

CD9, CD63, CD81 のそれぞれで標識される 100nm 程度の小胞構造を認めた (図 3C)。

エクソソーム中の miRNA 発現解析, 機能評価

α シヌクレイン陽性細胞質内封入体が形成された際の miRNA の変化を検討するために, α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレインを共導入した細胞と, α シヌクレイン遺伝子のみを導入した細胞を比較した. 各々 5 回独立した導入を行い, 各培養培地より超遠心法にて回収した sEV 分画から exRNA を回収し, 2,578 種類の miRNA の発現量を解析した. 両群のいずれかにおいてマイクロアレイのシグナルが確認できた miRNA は 1,036 種類であった. その中で発現量に両群間で有意な差を認めた miRNA は 117 種類であった. これら 117 種類の miRNA の発

現量によって, 階層クラスター分析を行ったところ, α シヌクレイン陽性の細胞質内封入体形成の有無により 2 群に区別された (図 4A). また, miRNA は, 発現量でほぼ 4 群に大別された. この内 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成の有無により, 2 倍以上の発現変化を認めた miRNA は 29 種類であった. そのうち 28 種類が α シヌクレイン陽性封入体を形成した場合に発現が増加し, 1 種類が減少していた (図 4B) (表 1).

発現に有意差があった 117 種類の miRNA について, TargetScanHuman7.2 を用いて文献的に MSA 病態への関与が示唆される 15 種類の RNA への結合性を検索した (表 2)¹⁷⁾¹⁸⁾. その結果, hsa-miR-4484 (Fold change 3.15, P=0.0103) と hsa-miR-2392 (Fold change 1.46, P=0.0175) が, 共に, gamma aminobutyric acid A (GABA)

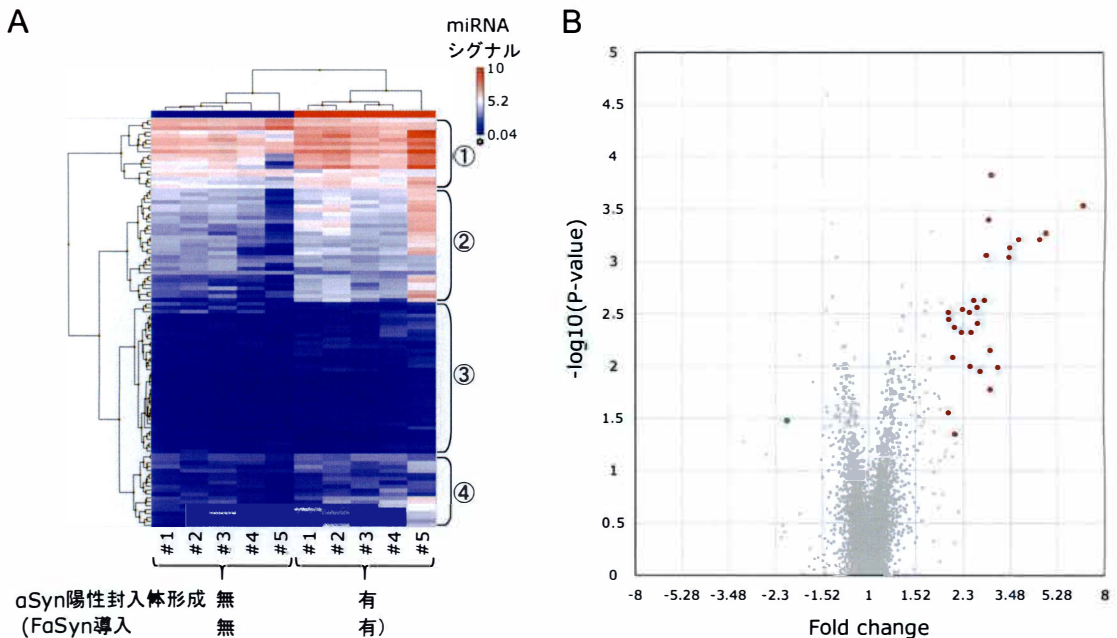


図 4 マイクロアレイ解析結果

(A) α シヌクレイン陽性封入体形成の有無による 2 群のエクソソーム内 miRNA 発現. 両群間の発現に有意差を認めた miRNA 117 種類について, 階層クラスター分析を行った結果を示す. miRNA の発現プロファイルは比較群ごとに集約された. また, この 117 種類の miRNA は, 全体に封入体形成に伴って発現が増加する傾向にあり, また, 発現量でほぼ 4 群に大別された (図中①~④).

(B) miRNA 発現のボルケーノプロット. α シヌクレイン陽性封入体形成の有無により, 統計学的有意差をもって, 2 倍以上の発現変化を認めたエクソソーム内 miRNA は 29 種類あった. うち 28 種類が α シヌクレイン封入体形成に伴い発現が増加 (赤), 1 種類が減少していた (緑).

表1 マイクロアレイ解析によるmiRNA発現変化

α シヌクレイン陽性封入体形成に伴う発現変化	miRNA	Fold Change	P-value	患者体液中の変化や機能報告	文献
減少	hsa-miR-29c-5p	-2.08	0.0332	片頭痛発作時に増加	19)
増加	hsa-miR-4530	6.54	0.0003	ALS患者血清中で減少	20), 21)
	hsa-miR-663a	4.75	0.0005	MSA患者血清中で増加	5)
				ALS-FUS患者由来のリンパ芽球細胞内で減少	22)
				FTD患者血漿中で減少	23)
				小胞体ストレスにより産生亢進	24)
	hsa-miR-4516	4.55	0.0006	ALS患者血漿sEVで変化なし	25)
				ALS患者血清中では減少	20)
	hsa-miR-1908-5p	3.76	0.0006		
	hsa-miR-4497	3.5	0.0007	ALS患者血清中で減少	20), 21)
	hsa-miR-1469	3.46	0.0009	ALS患者血清中で減少	20), 21)
	hsa-miR-4484	3.15	0.0103		
				ALS患者血漿sEV中で増加	25)
	hsa-miR-6088	2.97	0.0073		
	hsa-miR-6800-5p	2.94	0.0164		
	hsa-miR-4508	2.92	0.0001	ALS患者血清中で減少 AD患者血清中で変化なし	20), 21)
				マンガン中毒モデルの神経培養細胞内で増加	26)
	hsa-miR-3196	2.85	0.0004	家族性ALS患者血清中で減少	20)
	hsa-miR-6724-5p	2.8	0.0009		
	hsa-miR-7704	2.79	0.0023	マンガン中毒モデルの神経培養細胞内で増加	26)
	hsa-miR-6789-5p	2.7	0.0112		
	hsa-miR-1237-5p	2.64	0.0039		
	hsa-miR-6125	2.6	0.0027		
	hsa-miR-6816-5p	2.55	0.0023		
	hsa-miR-762	2.48	0.0048	ミトコンドリア中miR-762の増加がアポトーシスを調整	27)
	hsa-miR-4687-3p	2.47	0.0102		
	hsa-miR-1915-3p	2.44	0.003	ALS患者血清中で減少	21)
	hsa-miR-6869-5p	2.34	0.0029		
	hsa-miR-6090	2.29	0.0047		
	hsa-miR-8072	2.17	0.0043		
	hsa-miR-6883-5p	2.12	0.0454		
	hsa-miR-6087	2.11	0.0084	マンガン中毒モデルの神経培養細胞内で増加 海馬硬化症側頭葉組織で増加	26) 28)
	hsa-miR-6729-5p	2.05	0.0031		
	hsa-miR-3960	2.04	0.0035	ALS患者血清中で減少 AD患者血清中で変化なし	20), 21)
	hsa-miR-6749-5p	2.01	0.0279		

α シヌクレイン陽性封入体形成に伴い、統計学的有意差をもって、2倍以上の発現変化を認めた29種類のmiRNA、およびそれらの既報における神経患者体液中の変化や機能、性質を示す。

ALS (amyotrophic lateral sclerosis; 筋萎縮性側索硬化症), AD (Alzheimer's disease; アルツハイマー病), FUS (fused in sarcoma; 家族性ALS (ALS6)の責任遺伝子), FTD (frontotemporal dementia; 前頭側頭型認知症)

表2 miRNAの標的遺伝子検索

	遺伝子	文献
検索対象	<i>SNCA, COQ2, MAPT, IL1B, TNF, GBA, FBXO47, EDNI, SHC2, SLC1A4, SNRPN, NMD3, MAP1LC3A, GABARAP, GABARAPL2</i>	17), 18)
	↓	
結合可能性あり	<i>GABARAP</i> (<i>hsa-miR-4484, hsa-miR-2392</i>)	

α シヌクレイン陽性封入体形成に伴い、統計学的有意差をもって、発現変化を認めた117種類のmiRNAについて、TargetScanHuman7.2を用いて文献的にMSA病態への関与が示唆される15種類のRNAへの結合性を検索した。Hsa-miR-4484とhsa-miR-2392に、*GABARAP* RNAへの結合可能性が示されたが、その他、*COQ2, MAPT*や*SNCA* RNAなどへの結合可能性を示すmiRNAは認めなかった。

receptor associated protein (*GABARAP*) 蛋白をコードするRNAへの結合可能性が示された。一方、*COQ2, MAPT*や*SNCA* RNAへの結合可能性を示すmiRNAは認めなかった(表2)。

考 察

著者は、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を形成したヒトオリゴデンドロサイト系培養細胞由来のエクソソーム内miRNA発現プロファイルを検討した。その結果、封入体形成細胞由来のエクソソーム内に特異的なmiRNA発現プロファイルを見出した。この事実は、MSAでも、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を形成したオリゴデンドロサイト由来のエクソソームには、特異的なmiRNA発現プロファイルがある可能性を示唆する。これは、オリゴデンドロサイト由来のエクソソーム内のmiRNAが、本症のバイオマーカーとして有用であるとする著者の仮説を支持する。今後、実際のヒト罹患組織にて今回見出したmiRNAの変化を検証し、その後、ヒト生体試料由来エクソソーム内miRNAの検証に進む必要がある。

今回同定した、統計学的有意差をもって、2倍以上の発現変化を認めたmiRNAは29種類であった。これらには、筋萎縮性側索硬化症患者由来試料で変化が報告されているものが多く含まれた(表1)^{5) 19) - 28)}。しかし、多くは、疾患で減少し

ており、その挙動が今回の結果とは一致せず、これらの生理的意義は不明である。一方、MSA患者検体での変化が報告され、かつ本研究で統計学的有意差を認めたmiRNAは4種類であった。(表3)^{5) 7) 8)}。しかし、この内、既報と挙動が一致し、増加したものはhsa-miR-663aのみであった。このmiRNAは、小胞体ストレスにより増加し、この点からも α シヌクレイン陽性細胞質内封入体の形成を反映している可能性がある²⁹⁾。しかし、小胞体ストレスにより増加するのであれば、疾患特異性には欠ける可能性があり、他の封入体形成モデルや神経変性疾患との比較が必須である。また3種類のmiRNA, hsa-miR-4508 (Fold change 2.92, P=0.0001), hsa-miR-92a-3p (Fold change 2.79, P=0.0023), hsa-miR-6087 (Fold change 2.11, P=0.0084) は、マンガン負荷下の神経培養細胞において増加すると報告されている(表1)。興味深い事に、マンガン暴露は α シヌクレイン蛋白のミスフォールディングを生じる³⁰⁾。よって、これらのmiRNAの変化は、 α シヌクレイン蛋白のミスフォールディングを反映している可能性がある。

次に、同定されたmiRNAの標的遺伝子について、MSA病態への関与が示唆される15種類のRNAについて検討し、2種類のmiRNA, hsa-miR-4484とhsa-miR-2392において、*GABARAP* 蛋白をコードするRNAへ結合する可能性が示された。*GABARAP*はMSA患者剖検組織で発現減少が

表3 MSA 体液中 miRNA 発現との比較

本研究での検出				既報		
α シヌクレイン陽性封入体形成に伴う発現変化	miRNA	Fold Change	P-value	MSA 患者体液中の発現変化	発現変化合致	参考文献
増加	hsa-miR-663a	4.75	0.0005	増加 (血清)	○	5)
	hsa-miR-149-3p	1.9	0.0024	減少 (血清)		5)
	hsa-miR-4270	1.65	0.0025	減少 (血清)		5)
	hsa-miR-92a-3p	1.46	0.0292	増加 (血清) 減少 (脳脊髄液)		7) 8)

本研究において検出された miRNA のうち、 α シヌクレイン陽性封入体形成に伴う発現変化に統計学的有意差を認め、かつ、MSA 患者体液中での変化に既報のある 4 種類を提示する。○にて示す、本研究の結果と発現変化と既報の患者体液中での挙動が合致したものは、発現が増加していた hsa-miR-663a のみであった。

報告されており、これらの miRNA の増加との関連が推察される¹⁸⁾。GABARAP は抑制系神経伝達に重要な GABA_A 受容体の $\gamma 2$ サブユニットに結合し、シナプス膜への輸送を調節する³¹⁾。さらに、GABARAP はオートファジーにおいて必要とされる³²⁾。オートファジーは細胞内の老廃物、異常蛋白や障害オルガネラの主要な除去機構であり、恒常性の維持に重要である³³⁾。MSA でも、このオートファジー障害の可能性が示唆されている¹⁸⁾。よって、これらの miRNA の増加に伴う GABARAP 発現減少は MSA 病態機序に直接関与している可能性がある。

本研究の限界としては、次の様な点があげられる。1つ目は、マイクロアレイチップに搭載されていない未知の miRNA や miRNA 以外の RNA の変化が評価できない点である。2つ目は、本研究で作成した封入体が MSA で認める封入体を正確に反映していない可能性がある点である。MSA の封入体の主要構成蛋白は α シヌクレインであるが、そのほか 30 種ほどの蛋白を含んでいる³⁴⁾。さらに、同じ α シヌクレインの異常蓄積を来すパーキンソン病やレビー小体型認知症とは、 α シヌクレインの構造に差異がある³⁵⁾。今回用いたモデル細胞系が、MSA で認められる α シヌクレイン陽性細胞質内封入体の生化学的特性を反映していない可能性がある。また、今回、標的遺伝子の検索や機能評価は、発現変化の大きな

miRNA を対象とした。しかし、より発現変化の小さいものでも、神経系細胞に影響が重大である miRNA や、病態に強く関与する miRNA が存在しうる。さらに、今回の結果は、既報の MSA 罹患組織での miRNA の発現変化¹⁷⁾の多くを再現しえなかったが、この要因として、オリゴデンドロサイトだけではなく、他の細胞種の影響も考えられる。これらの問題点をふまえ、ヒト罹患組織での検証が必要である。

著者は、オリゴデンドロサイト系培養細胞中で α シヌクレイン蛋白による細胞質封入体を形成し、その際のエクソソーム内 miRNA 発現プロファイルの変化を見出した。今後は、ヒト患者組織や脳脊髄液など体液由来の exRNA にて検証する必要がある。さらに、この同定した miRNA に関わる遺伝子やその蛋白の MSA の病態機序への関与について検討する必要がある。本研究において確立した、安定したエクソソームの分離および exRNA の抽出の手技は様々な検体に応用が可能である。さらに、MSA 以外の神経変性疾患を対象とすることも可能であり、神経変性疾患の疾患特異的な診断バイオマーカーの開発や病態解明を進めていくことが期待される。

結 論

患者体液検体にも応用可能なエクソソームの分離および exRNA の抽出手技を確立し、 α シヌクレイン陽性細胞質内封入体形成に伴う、ヒトオリゴデンドロサイト系培養細胞由来のエクソソーム内 miRNA 発現プロファイルの変化を見出した。この変化は、MSA の診断バイオマーカーの候補となるだけでなく、MSA の病態解明、さらには神経変性疾患における神経変性機序の解明にも有用であると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり貴重なテーマをご指導いただきました新潟大学脳研究所神経内科 教授 小野寺理先生、研究全般にわたり直接的な指導をいただきました新潟大学医学部法医学教室 小山哲秀先生、新潟大学大学院医歯学総合研究科臓器連関学寄付講座 横関明男先生、エクソソームの電子顕微鏡観察に際しご協力いただきました新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学教室 教授 柿田明美先生、濁川慎吾先生、そのほかご指導、ご支援を頂いた諸先生方に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Fanciulli A and Wenning GK: Multiple-system atrophy. *New England Journal of Medicine* 372: 249-263, 2015.
- 2) Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M and Sobue G: Progression and prognosis in multiple system atrophy. *Brain* 125: 1070-1083, 2002.
- 3) Bartel DP: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* vol. 116 281-297, 2004.
- 4) Kosaka N, Kogure A, Yamamoto T, Urabe F, Usuba W, Prieto-Vila M and Ochiya T : Exploiting the message from cancer: the diagnostic value of extracellular vesicles for clinical applications. *Exp. Mol. Med.* 51: 1-9, 2019.
- 5) Uwatoko H, Hama Y, Iwata IT, Shirai S, Matsushima M, Yabe I, Utsumi J and Sasaki H: Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Mol. Brain* 12: 1-10, 2019.
- 6) Marques TM, Kuiperij HB, Bruinsma IB, van Rumund A, Aerts MB, Esselink RAJ, Bloem BR and Verbeek MM: MicroRNAs in Cerebrospinal Fluid as Potential Biomarkers for Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Mol. Neurobiol.* 54: 7736-7745, 2017.
- 7) Kume K, Iwama H, Deguchj K, Ikeda K, Takata T, Kokudo Y, Kamada M, Fujikawa K, Hirose K, Masugata H, Touge T and Masaki T: Serum MicroRNA expression profiling in patients with multiple system atrophy. *Mol. Med. Rep.* 17: 852-860, 2018.
- 8) Starhof C, Hejl AM, Heegaard NHH, Carlsen AL, Burton M, Lilje B and Winge K: The biomarker potential of cell-free microRNA from cerebrospinal fluid in Parkinsonian Syndromes. *Mov. Disord.* 34: 246-254, 2019.
- 9) Ramaswamy P, Christopher R, Pal PK and Yadav R: MicroRNAs to differentiate Parkinsonian disorders: Advances in biomarkers and therapeutics. *Journal of the Neurological Sciences* 394: 26-37, 2018.
- 10) Raposo G and Stoorvogel W: Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200: 373-383, 2013.
- 11) Tan L, Wu H, Liu Y, Zhao M, Li D and Lu Q: Recent advances of exosomes in immune modulation and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 49: 357-365, 2016.
- 12) Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S and Takahashi H: A-Synuclein Immunoreactivity in Glial Cytoplasmic Inclusions in Multiple System Atrophy. *Neurosci. Lett.* 249: 180-182, 1998.
- 13) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T and Hasegawa M: Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285: 34885-34898, 2010.
- 14) Lee BR and Kamitani T: Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PLoS One* 6: 2011.

- 15) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48: 452-458, 2013.
- 16) Théry C, Clayton A, Amigorena S and Raposo and G: Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 30: 3.22: 3.22.1-3.22.29, 2006.
- 17) Xiang C, Han S, Nao J and Cong S: MicroRNAs dysregulation and metabolism in multiple system atrophy. *Front. Neurosci.* 13: 1-10, 2019.
- 18) Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H and Wakabayashi K: Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* 49: 190-198, 2013.
- 19) Andersen HH, Duroux M and Gazerani P: Serum MicroRNA Signatures in Migraineurs During Attacks and in Pain-Free Periods. *Mol. Neurobiol.* 53: 1494-1500, 2016.
- 20) Freischmidt A, Müller K, Zondler L, Weydt P, Volk AE, Božič AL, Walter M, Bonin M, Mayer B, Von Arnim CAF, Otto M, Dieterich C, Holzmann K, Andersen PM, Ludolph AC, Danzer KM and Weishaupt JH: Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain* 137: 2938-2950, 2014.
- 21) Taguchi YH and Wang H: Exploring microRNA biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2018.
- 22) Freischmidt A, Müller K, Ludolph AC and Weishaupt JH: Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 1: 42, 2013.
- 23) Grasso M, Piscopo P, Talarico G, Ricci L, Crestini A, Tosto G, Gasparini M, Bruno G, Denti MA and Confaloni A: Plasma microRNA profiling distinguishes patients with frontotemporal dementia from healthy subjects. *Neurobiol. Aging* 84: 240. e1-240. e12, 2019.
- 24) Amodio G, Sasso E, D' Ambrosio C, Scaloni A, Moltedo O, Franceschelli S, Zambrano N and Remondelli P: Identification of a microRNA (miR-663a) induced by ER stress and its target gene PLOD3 by a combined microRNome and proteome approach. *Cell Biol. Toxicol.* 32: 285-303, 2016.
- 25) Katsu M, Hama Y, Utsumi J, Takashina K, Yasumatsu H, Mori F, Wakabayashi K, Shoji M and Sasaki H: MicroRNA expression profiles of neuron-derived extracellular vesicles in plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 708: 134176, 2019.
- 26) He R, Xie X, Lv L, Huang Y, Xia X, Chen X and Zhang L: Comprehensive investigation of aberrant microRNAs expression in cells culture model of MnCl2-induced neurodegenerative disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486: 342-348, 2017.
- 27) Yan K, An T, Zhai M, Huang Y, Wang Q, Wang Y, Zhang R, Wang T, Liu J, Zhang Y, Zhang J and Wang K: Mitochondrial miR-762 regulates apoptosis and myocardial infarction by impairing ND2. *Cell Death Dis.* 10: 2019.
- 28) Bencurova P, Baloun J, Musilova K, Radova L, Tichy B, Pail M, Zeman M, Brichtova E, Hermanova M, Pospisilova S, Mraz M and Brazdil M: MicroRNA and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Whole miRNome profiling of human hippocampus. *Epilepsia* 58: 1782-1793, 2017.
- 29) Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL and Lee MK: Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *J. Neurosci.* 32: 3306-3320, 2012.
- 30) Harischandra DS, Rokad D, Neal ML, Ghaisas S, Manne S, Sarkar S, Panicker N, Zenitsky G, Jin H, Lewis M, Huang X, Anantharam V, Kanthasamy A and Kanthasamy AG : Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of α -synuclein. *Sci. Signal.* 12: eaau4543, 2019.
- 31) Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H,

- Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss SJ, Yamamoto T, Nabekura J and Hirata M: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of $\gamma 2$ subunit-containing GABAA receptors to the cell surface. *J. Neurosci.* 27: 1692-1701, 2007.
- 32) Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V and Elazar Z: LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29: 1792-1802, 2010.
- 33) Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY and Han JY: Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* 44: 89-98, 2012.
- 34) Wakabayashi K and Takahashi H: Cellular pathology in multiple system atrophy. *Neuropathology* 26: 338-345, 2006.
- 35) Peng C, Gathagan RJ, Covell DJ, Medellin C, Stieber A, Robinson JL, Zhang B, Pitkin RM, Olufemi MF, Luk KC, Trojanowski JQ and Lee VM-Y: Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies. *Nature* 557: 558-563, 2018.

(令和2年1月16日受付)
