

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 笠原 壮
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 910 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 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

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 池内 健
副査 准教授 清水 宏

博士論文の要旨

【背景と目的】

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、パーキンソンニズム、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。近年、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、既報の方法では、罹患細胞の崩壊などによる副次的な変化が含まれている可能性があるため、早期診断には適していない。そこで申請者は、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、直径約 100nm 程度の、細胞外小胞 (small extracellular vesicle ; sEV) の1種である。エクソソームはドナー細胞由来の蛋白や核酸を含有し、その細胞内環境を反映している。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。

【方法】

ヒトグリア (オリゴデンドロサイト) ハイブリッド細胞株である M03.13 細胞を使用した。 α シヌクレイン遺伝子のみを導入した細胞と、さらに線維化 α シヌクレイン蛋白を同時に導入した細胞を作成し、免疫染色にて α シヌクレイン陽性の細胞質内封入体形成の有無を評価した。その際の細胞培養培地を回収し、超遠心法を用いて sEV 分画を分離した。sEV 分画中にエクソソームが含まれることは、エクソソーム表面マーカーである CD9, CD63, CD81 を対象とする免疫プロット、および電子顕微鏡法による観察で評価した。 α シヌクレイン陽性封入体形成の有無の2群について、エクソソーム内 RNA を抽出し、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。両群間で発現に有意差があった miRNA について、文献的に MSA 病態への関与が示唆される RNA への結合性を検索した

【結果】

α シヌクレイン遺伝子のみを導入した細胞に比して、 α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋

白を同時に導入した細胞では、明瞭な α シヌクレイン陽性細胞質内封入体を形成した。細胞培養培地から分離した sEV の免疫プロットにて、CD9, CD63, CD81 を認めた。さらに、電子顕微鏡による観察にて sEV 中の 100nm 程度の小胞構造を認め、エクソソームが含まれていることを確認した。 α シヌクレイン陽性封入体形成の有無の 2 群について、エクソソーム内 RNA の miRNA 発現量を解析した結果、両群のいずれかで発現を認めた miRNA は 1,036 種類あった。そのうち、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。これらを用いクラスター解析を行ったところ、 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。さらに、hsa-miR-4484 と hsa-miR-2392 が、共に gamma aminobutyric acid A 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。

【考察】

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質内封入体形成時に、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。しかし、本研究で統計学的有意差を認めた miRNA の内、MSA 患者検体での変化が既報と挙動が一致したものは、発現が増加した hsa-miR-663a のみであった。一方、MSA 患者において発現が低下する GABARAP 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 が見出され、MSA 病態機序に直接関与している可能性がある。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エクソソーム内 RNA の抽出の手法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。

審査結果の要旨

神経変性疾患である多系統萎縮症 (MSA) の診断バイオマーカーとしてマイクロ RNA (miRNA) が注目されている。申請者は、グリア様培養細胞を用いて、MSA の病態を模倣すると考えられる in vitro モデルを作成し、この細胞由来のエクソソームに含まれる miRNA を解析した。まず、グリア様培養細胞株に α シヌクレイン遺伝子と線維化 α シヌクレイン蛋白質を同時に導入し、MSA 病態に類似した α シヌクレイン陽性封入体の形成を観察した。一方で、 α シヌクレイン遺伝子のみを導入した場合には、封入体は形成されないことを確認した。これらの細胞の培養上清から超遠心により分離したエクソソームに含まれる miRNA をマイクロアレイにより解析し、細胞封入体形成時に 2 倍以上に発現増加する 28 種と、減少する 1 種を同定した。これらの miRNA には、MSA 患者において発現低下する GABARAP mRNA に結合可能性のある has-miR-4484 と has-miR-2392 や、MSA 患者検体において発現変化が報告されている has-miR-663a が含まれた。これらの miRNA は、オートファジーの障害や α シヌクレインのミスフォールディングへ関与する可能性が考えられる。

以上の結果は、MSA の診断マーカーの創出や病態機序の解明においてエクソソーム内 miRNA の解析が有用であることを示しており、学位論文としての価値が認められる。