
原 著

アルツハイマー病・病理ステージの進行に関連して変動する 血液マイクロ RNA の同定

原 範 和

新潟大学脳研究所 附属生命科学リソース研究センター

バイオリソース研究部門 遺伝子機能解析学分野

(指導：池内 健教授)

Identification of MicroRNAs in Blood Associated with the Progression of Alzheimer's Disease

Norikazu HARA

Department of Molecular Genetics, Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Takeshi IKEYUCHI)

要 旨

マイクロ RNA は、血清や血漿といった体液中においても比較的安定した状態で存在しており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血液バイオマーカーを同定することを目的に、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 (病理サンプルセット) から死亡前 2 週間以内に採取された血清を用い、マイクロ RNA 量を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。その結果、3 つのマイクロ RNA (hsa-miR-501-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-26b-5p) が AD 群と対照群との間で有意に変動した。このうち hsa-miR-501-3p は、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においても、血清中で有意に変動していることが定量 PCR 解析により示された (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 score の低下と有意に相関していた。さらに hsa-miR-501-3p は、血清中の減少とは反対に、脳内では著しく増加していることが同じ被験者の剖検脳サンプルを解析することによって明らかにされた。この 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

Reprint requests to: Norikazu HARA
Department of Molecular Genetics,
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 附属生命科学リソース研究センター
バイオリソース研究部門 遺伝子機能解析学分野

原 範 和

らの変動した遺伝子は DNA 複製や細胞周期といった生体内作用に関連していた。hsa-miR-501-3p は、AD 脳での病変の進行を反映する新規の血液バイオマーカーであることが示唆され、今後の実臨床の場での実用化が期待される。

キーワード：アルツハイマー病、バイオマーカー、マイクロ RNA、次世代シーケンサー、miR-501-3p、Braak ステージ

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、高齢者における認知症の中で最も多い原因疾患である。AD を特徴づける神経病理学的な変化は、細胞外に蓄積するアミロイド B (amyloid- β : A β) から成る老人斑と、神経細胞内に凝集する異常リン酸化タウから成る神経原線維変化 (neurofibrillary tangles: NFT) である。これらの病変は臨床症状が現れる以前より脳内に不可逆的に出現する。現在のところ AD の治療は対症療法のみが可能であり、病態の進行を阻止する根本治療法は未確立である。AD の発症および進行のメカニズムを理解するためには、AD 発症前の前駆段階で病態の進行を捉えることが重要であると思われる。AD を早期段階で診断し治療介入することは、認知症患者やその家族にとって大きな意義があると考えられる¹⁾。

AD の初期に認められる脳内病理変化を検出するため、分子イメージングや脳脊髄液中および末梢血中バイオマーカーの開発が進められている。例えば、Pittsburg Compound B を用いた放射断層撮影法による分子イメージングは、脳内での A β 蓄積を AD の臨床症状が現れる前の初期段階から生体内で捉えることができる。しかしながら、分子イメージング検査は費用が高価であり、かつ実施可能な施設が限定される。また、脳脊髄液中の A β およびタウタンパクの測定は AD を高率に診断可能なバイオマーカーとして確立されているが²⁾³⁾、腰椎穿刺による脳脊髄液の採取は患者への負担が比較的大きく、多数の患者に検査を実施することは困難である。一方で、血液の採取は患者への負担が少なく、非侵襲的な検査として広く医療現場に浸透している。有用な血液バイオマーカーが確

立されれば、多人数を効率良くスクリーニングできるであろう。最近のテクノロジーの進歩により、AD の血液バイオマーカーの候補がペプチドや脂質代謝物、核酸などさまざまな微量分子から見つかってきている⁴⁾。

マイクロ RNA は、血液バイオマーカーとして注目されている分子の一つである。マイクロ RNA は約 22 塩基の低分子非翻訳 RNA で、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に配列を認識して結合する。結合したマイクロ RNA は、RNA 誘導型サイレンシング複合体を形成し、mRNA の不安定化や翻訳の阻害により標的遺伝子の遺伝子発現を抑制する⁵⁾⁶⁾。マイクロ RNA は、血清や血漿のような体液中ではエクソソームなどの小胞に包まれているため、流血中でも比較的安定して存在している⁷⁾。近年、複数の血液マイクロ RNA 量を調べることで、AD や軽度認知障害の患者を認知機能正常な対照者から識別できる可能性が示されている^{8) - 14)}。例えば、血漿中の miR-132 フェミリー (miR-128, miR-132, miR-874) を解析すると、年齢適合対照群から軽度認知障害群を高率 (感度 84-94%, 特異度 96-98%) に判別することができたと報告されている¹²⁾。マイクロ RNA の変動は、AD 脳においても報告されている^{15) - 17)}。Hébert らは、miR-29a/b-1 クラスターの発現量が AD 脳で減少しており、その減少は A β 産生につながる BACE1 タンパクの高発現と相関していることを明らかにした。これらのマイクロ RNA は BACE1 の発現量を直接的に制御していることが示唆される¹⁵⁾。このようにマイクロ RNA の AD 病理への関与が明らかにされてきているが、病変のある脳内と末梢血中との間でマイクロ RNA 量に関連があるかどうかについては不明である。そこで本研究では、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 量について次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。

材料と方法

被験者

AD に対する血清マイクロ RNA バイオマーカーを同定するために、2つのサンプルセットを用意した。探索用サンプルセット (ROW) は、日本神経科学ブレインバンクネットワーク (JBBNNR) から得た検体により構成される。JBBNNR では、剖検脳は病理診断により Braak ステージの分類が行われる¹⁸⁾¹⁹⁾。血清は、被検者の死亡前 2 週間以内に採取された残余サンプルを使用した。同じ被験者から側頭葉皮質組織が剖検時に採取され、解析に使用するまで -80℃ で凍結保存された。検証サンプルセット (NIG) は、新潟大学医歯学総合病院で集められた臨床診断された検体により構成される。AD の臨床診断は、National Institute of Neurological and Communicative Diseases and the Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association の基準に準じて行われた²⁰⁾。被験者より採取された血清は、解析に使用するまで -80℃ で適切に保存された。被検者もしくは法定後見人からインフォームド・コンセントを取得した。本研究は、新潟大学医学部および東京都健康長寿医療センターの倫理委員会により承認された。検体はすべて匿名化した状態で解析された。

APOE 遺伝型の決定

脳もしくは血液サンプルからゲノム DNA を単離し、既報の方法に従い APOE 遺伝型を決定した²¹⁾。

RNA の抽出

遊離 RNA は、血清 (200 μ L) から miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して単離した。NIG 検証サンプルセットでは、定量 PCR 解析のため、 5.6×10^8 コピーの合成 cel-miR-39-3p (miRNeasy Serum/Plasma

Spike-In Control; QIAGEN) が各血清サンプルに添加され、標準化および取量の確認のために使われた。血清 RNA は、最終的に 14 μ L の RNase フリーの精製水に溶出した。

総 RNA は、凍結側頭葉皮質の小片もしくは培養細胞より TRIzol Plus RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて単離した。単離された総 RNA は、アジレント 2100 バイオアナライザーにより RIN (RNA integrity number) 値を決定した。RIN は、mRNA の品質を表す指標で、1 点 (悪) から 10 点 (良) で評価する。

Small RNA - Seq

Small RNA シークエンシング (RNA-Seq) ライブラリーは、TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、1 μ g の総 RNA もしくは 5 μ L の血清 RNA より作製した。ライブラリーはイルミナ社の次世代シーケンサー (Genome Analyzer IIx; GAIIx) でシーケンスを行い、各ライブラリー 2000 万以上のシングルエンドリードが得られた。シーケンスリードは、アダプタ配列を cutadapt²²⁾ を用いて除去した後、ヒト参照配列 (hg19) に bowtie²³⁾ を用いてマッピングした。マッピングされたリードの数は、HTSeq²⁴⁾ を用いて、miRBase release 20²⁵⁾ に登録されているマイクロ RNA ごとにカウントした。カウントされたリード数は、DESeq2²⁶⁾ に組み込まれている median-of-ratios 法により標準化した。低発現のマイクロ RNA を除外するため、標準化リード数の全検体における平均値が 50 以下のマイクロ RNA は解析から除外した。DESeq2 を用いて発現変動解析を行い、AD 群と対照群との間で有意に変動するマイクロ RNA を同定した。また、共変量に年齢および性別、APOE 遺伝型、溶血率または RIN を加え、これらの変数を補正した上で発現変動解析も行った。P 値は、Wald 検定によって算出されたのち、Benjamini-Hochberg 法²⁷⁾ を用いて多重検定補正のために調整した。補正後の P 値が 0.05 未満 (5% false discovery rate: FDR) のマイクロ RNA を統計的

に有意と判断した。

溶血の評価

血清サンプルの溶血の度合いを検出するため、遊離ヘモグロビン量を分光光度計により測定した。血清12 μ Lを48 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水で希釈したのち、吸光度414 nmと375 nmの比(溶血率; $A_{414/375}$)を決定した。溶血率が高値な場合、溶血の度合いが高いことを意味する²⁸⁾²⁹⁾。NIG検証サンプルセットでは溶血率が2を超えた血清サンプルは解析から除外した。

定量PCR

候補となる血清マイクロRNAは、TaqMan Micro RNA Assays (Thermo Fisher Scientific)を用いた定量PCRにより再現性を確認した。5 μ Lの血清をTaqMan MicroRNA Reverse Transcription kitにより逆転写を行った。逆転写反応は15 μ Lの反応系で行い、3つの標的マイクロRNAプライマー(hsa-miR-501-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-26b-5p)と2つの標準化マイクロRNAプライマー(ce1-miR-39-3p, hsa-miR-451a)を終濃度0.2xとなるように加えた。逆転写反応物のうち5 μ Lを使い、TaqMan PreAmp Master Mixを用いて12サイクルのPCRにより増幅した。このPCR反応は25 μ Lの反応系で行い、上記5つのRNAプライマーを終濃度0.03xとなるように加えた。増幅されたPCR反応物は0.1xのTE 100 μ Lで希釈した。希釈した反応物のうち5 μ Lを使用して定量PCRを行った。定量PCR反応は、ABI PRISM 7900HT上で各マイクロRNAのTaqMan Micro RNA Assayを用いて、384穴プレートに20 μ Lの反応系で3重測定を行った。マイクロRNAの相対発現量を、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法³⁰⁾によりce1-miR-39-3p(スパイクイン)とhsa-miR-451a(内在性コントロール)を標準化に用いて算出した。

細胞培養とマイクロRNA強制発現

ヒト神経芽細胞腫株SH-SY5Yは、minimum essential mediaおよびHam's F12 nutrient mixtureを等量混合し、ウシ胎児血清10%およびベ

ニシリン-ストレプトマイシン1%を添加した培養液で培養した。細胞をディッシュ上で1日培養した後、終濃度50 nMとなるようにhsa-miR-501-3p mimic (MC12927; Thermo Fisher Scientific)またはscramble control (mirVanaTM miRNA Mimic, Negative Control #1; Thermo Fisher Scientific)を、NeuroMag (OZ Biosciences, San Diego, CA, USA)を用いて細胞へ遺伝子導入した。24時間後、TRIzol試薬を用いて細胞を回収し、RNA抽出を行った。

mRNA-SeqおよびGene Ontology解析

mRNA-Seqライブラリーは、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)を用いて500 ngの総RNAより作製した。ライブラリーはGAIIXでシーケンスを行い、長さ75 bpのシングルエンドリードが約4,000万本、各ライブラリーより得られた。シーケンスリードはSTAR³¹⁾を用いてヒト参照配列(hg19)にマッピングした。DESeq2²⁶⁾を用いて遺伝子発現変動解析を行い、補正後のP値が0.05未満(5% FDR)の遺伝子を統計的に有意とみなした。有意に発現変動していた遺伝子群に対し、DAVID 6.8³²⁾³³⁾を用いてGene Ontology解析を行った。Gene OntologyカテゴリーのGOTERM_BP_DIRECTを利用し、P値0.05未満(5% FDR)のGene Ontologyを統計的に有意とみなした。

結 果

ADに対する血清マイクロRNAバイオマーカー候補の探索

ROW探索用サンプルセットを準備するため、剖検脳サンプルと血清サンプルの両方が活用できる症例を選択した。さらにBraakステージ分類に従い¹⁸⁾¹⁹⁾、Braak NFTステージがIV, V, VIのいずれかであったBraak amyloidステージがCの症例をAD、Braak NFTステージが0, I, IIのいずれかであったBraak amyloidステージが0またはAの症例を対照検体と定義した(図1)³⁴⁾。この定義により、移行段階の症例(例えばBraak NFTステー

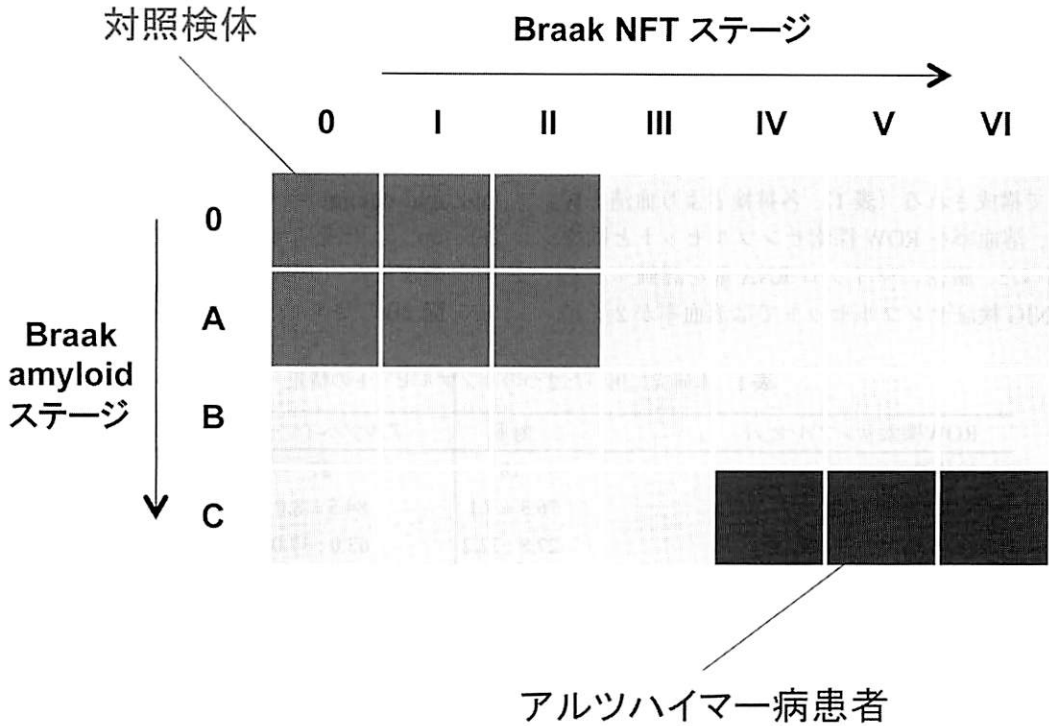


図 1 ROW 探索用サンプルセットにおける Braak ステージに基づいたアルツハイマー病患者と対照検体の選別

Braak NFT ステージが IV, V, VI のいずれかであったかつ Braak amyloid ステージが C の症例をアルツハイマー病患者 (赤いセル), Braak NFT ステージが 0, I, II のいずれかであったかつ Braak amyloid ステージが 0 または A の症例を対照検体 (青いセル) と定義した。

ジ III の症例) を除外し, 典型的な AD 患者と病理変化が明らかでない対照検体との差を検出できるように設定した。その結果, 神経病理学的に診断された AD 患者 27 名と対照者 18 名を解析対象とした。ROW 探索用サンプルセットは, 死亡時年齢および性別, 脳重量, RIN 値に関して AD 群と対照群との間に有意な差 ($P < 0.05$) を認められた (表 1)。

被験者の死亡前 2 週間以内に採取された血清より遊離 RNA を単離した。血清 RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し, AD 群と対照群との間で変動するマイクロ RNA を調べた。標準化リード数の平均値を利用して低発現マイクロ RNA を除外した結果, 148 個のマイクロ RNA が解析に使用された。このうち 3 つのマイクロ RNA:

hsa-miR-501-3p (補正後 P 値 = 0.002, \log_2 fold change = -1.58), hsa-let-7f-5p (補正後 P 値 = 0.026, \log_2 fold change = 1.00), hsa-miR-26b-5p (補正後 P 値 = 0.026, \log_2 fold change = 0.93) が有意に変動していた。AD 患者群において hsa-miR-501-3p は減少し, hsa-let-7f-5p および hsa-miR-26b-5p は増加していた (図 2A)。特に hsa-miR-501-3p は, 死亡時年齢および性別, APOE 遺伝型, 溶血率を補正した検定でも有意な変動が認められた (補正後 P 値 = 0.004, \log_2 fold change = -2.07; 表 2)。溶血によってマイクロ RNA 量が増加する可能性を考慮し²⁹⁾, 溶血率を共変量に加えた。

候補マイクロRNAの検証

3つの候補血清マイクロRNAの変動を検証するため、別のサンプルセット(NIG)を解析した。NIG検証サンプルセットは臨床診断された36名のAD患者と22名の認知機能正常な年齢適合対照者で構成される(表1)。各被検者より血清を採取し、溶血率をROW探索サンプルセットと同様に調べた。厳密にマイクロRNA量を評価するため、NIG検証サンプルセットでは溶血率が2を超

える血清サンプルはZanuttoらに従い²⁸⁾解析から除外した。非溶血血清サンプルから遊離RNAを単離し、定量PCRによってマイクロRNA量を定量した。その結果、hsa-miR-501-3pについては有意な発現変動が認められた($P=0.00002$, \log_2 fold change = -0.54 ; 図2B)。hsa-miR-26b-5pは、有意には至らなかったが同様の増加傾向を認めた($P=0.066$, \log_2 fold change = 0.20 ; 図2B)。さらに、血清hsa-miR-501-3p量

表1 本研究に用いた2つのサンプルセットの情報

ROW探索サンプルセット	対照	アルツハイマー病	P
検体数	18	27	-
死亡時年齢(歳)	76.3 ± 7.1	84.5 ± 8.0	0.001 ¹
性別, % (女性: 男性)	27.8 : 72.2	63.0 : 37.0	0.033 ²
死後脳経過時間(時)	9.6 ± 9.4	13.4 ± 11.6	0.158 ¹
脳重量(グラム)	1268 ± 127	1156 ± 120	0.003 ¹
RIN			
側頭葉皮質	7.9 ± 0.8	7.1 ± 1.2	0.006 ¹
溶血率			
血清	1.9 ± 0.6	1.7 ± 0.5	0.105 ¹
APOE			
遺伝型, % (ε3*3 : ε3*4 : ε4*4)	55.6 : 44.4 : 0.0	44.4 : 25.9 : 29.6	0.550 ³
アリル, % (ε3 : ε4)	77.8 : 22.2	57.4 : 42.6	0.069 ³
NIG検証サンプルセット	対照	アルツハイマー病	P
検体数	22	36	-
検査時年齢(歳)	73.7 ± 8.4	74.7 ± 7.3	0.556 ¹
性別, % (女性: 男性)	80.0 : 20.0	63.9 : 36.1	0.333 ²
MMSE	29.3 ± 0.7	19.3 ± 5.4	4.8.E-08 ¹
溶血率			
血清	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.316 ¹
APOE			
遺伝型, % (ε3*3 : ε3*4)	85.7 : 14.3	55.6 : 44.4	0.056 ³
アリル, % (ε3 : ε4)	92.9 : 7.1	77.8 : 22.2	0.090 ³

略語: APOE, apolipoprotein E; MMSE, mini-mental state examination; RIN, RNA integrity number.

¹ Mann-WhitneyのU検定によりアルツハイマー病群と対照群との差を検定した。

² フィッシャーの正確確率検定により男女比率を検定した。

³ フィッシャーの正確確率検定によりAPOE ε4アリルの比率(ε4保因者とε4非保因者)を検定した。

データは平均±標準偏差で表している。

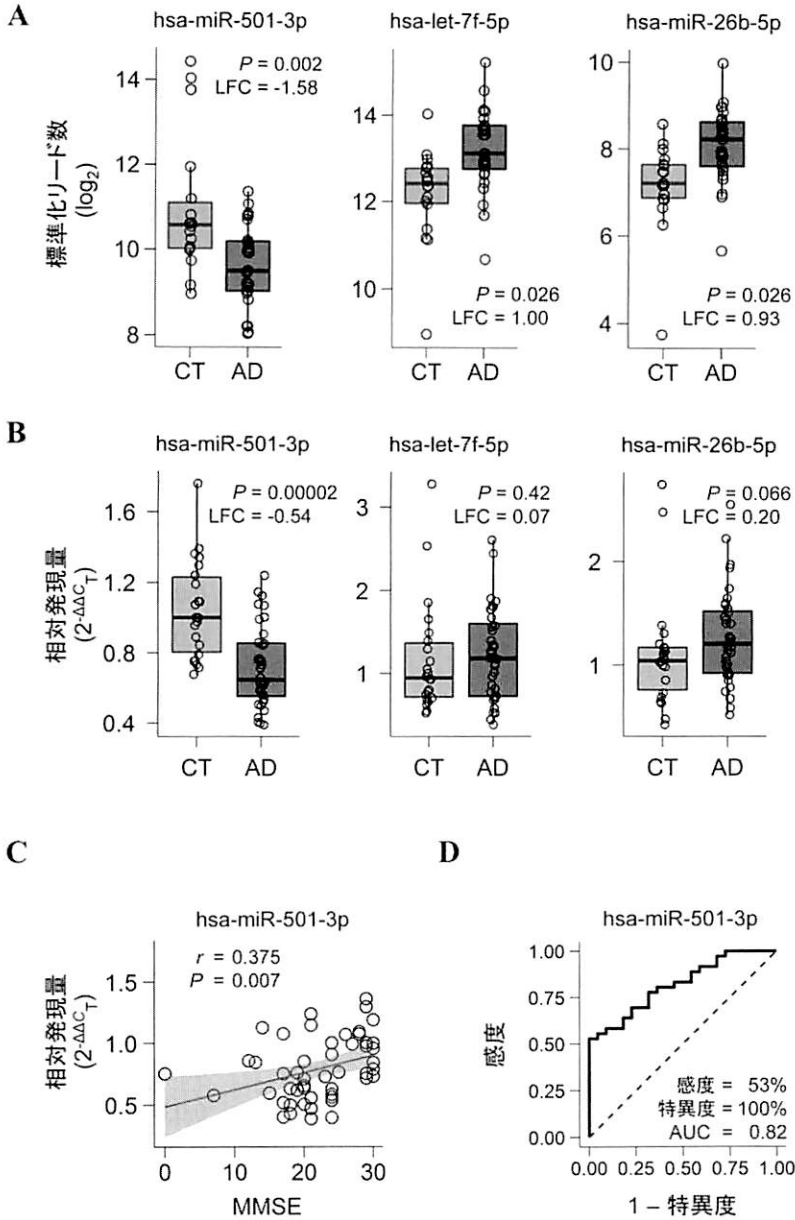


図2 アルツハイマー病患者 (AD) と対照検体 (CT) を判別する新規の血清マイクロ RNA バイオマーカーの同定

- (A) ROW 探索用サンプルセットにおいて AD 群と対照群との間で有意に変動した 3 つの血清マイクロ RNA の発現量。次世代シーケンサーより得られた標準化リード数を \log_2 スケールに変換後、箱ひげ図を用いて AD 群と対照群ごとに図示した。LFC, log2 fold change; P , 多重検定補正のため Benjamini-Hochberg 法により調整された後の P 値。
- (B) NIG 検証サンプルセットにおいて定量 PCR により解析された 3 つの血清マイクロ RNA の発現量。相対発現量は、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法により cel-miR-39-3p (スパイクイン) と hsa-miR-451a (内在性コントロール) を標準化に用いて算出した後、箱ひげ図を用いて AD 群と対照群ごとに図示

した。P値はAD群と対照群との差をMann-WhitneyのU検定により計算した。LFC, log₂ fold change.

- (C) NIG 検証サンプルセットにおける血清中の hsa-miR-501-3p 量と Mini-Mental State Examination (MMSE) スコアとの間の相関。定量 PCR により得られた相対発現量を縦軸に、MMSE を横軸にして散布図を作成した。r はスピアマンの順位相関係数を表す。
- (D) NIG 検証サンプルセットにおける血清 hsa-miR-501-3p の receiver-operating characteristic (ROC) 曲線解析。ROC 曲線解析の結果、感度 53 % および特異度 100 %, ROC 曲線下面積 (area under the curve: AUC) は 0.82 を示した。

表2 ROW 探索サンプルセットにおいて同定された上位20個の血清変動マイクロRNA

マイクロRNA	平均リード数	log ₂ fold change	補正前P値	補正後P値	順位
hsa-miR-501-3p	2,241	-2.07	2.7.E-05	0.004	1
hsa-let-7f-5p	9,185	1.06	0.004	0.189	2
hsa-miR-32-5p	61	2.28	0.004	0.189	2
hsa-miR-151a-3p	1,381	-1.21	0.008	0.308	4
hsa-miR-146a-5p	2,092	-1.54	0.012	0.358	5
hsa-miR-148a-3p	2,550	-1.26	0.018	0.467	6
hsa-miR-26b-5p	257	0.83	0.025	0.532	7
hsa-let-7a-5p	10,114	0.63	0.067	0.548	8
hsa-let-7c-5p	3,345	0.62	0.072	0.548	8
hsa-miR-100-5p	1,624	-1.15	0.036	0.548	8
hsa-miR-140-3p	567	0.51	0.064	0.548	8
hsa-miR-183-5p	56	-1.50	0.064	0.548	8
hsa-miR-186-5p	708	-0.54	0.072	0.548	8
hsa-miR-342-3p	215	-1.46	0.047	0.548	8
hsa-miR-4485	61	-1.99	0.063	0.548	8
hsa-miR-486-3p	464	-1.02	0.034	0.548	8
hsa-miR-500a-3p	256	-0.87	0.070	0.548	8
hsa-miR-502-3p	255	-0.87	0.071	0.548	8
hsa-miR-874-3p	61	-1.49	0.054	0.548	8
hsa-miR-98-5p	87	-1.17	0.043	0.548	8

略語: マイクロRNA, miRBase release 20に登録されている成熟マイクロRNAの名称; 平均リード数, 全検体における標準化リード数の平均値; log₂ fold change, アルツハイマー病(AD)患者群と対照群との発現量の差。正の値はAD群で高いことを, 負の値はAD群で低いことを示す; 補正前P値, 多重検定補正前のP値; 補正後P値, 多重検定補正のためBenjamini-Hochberg法により調整されたP値; 順位, 補正後P値による順位。

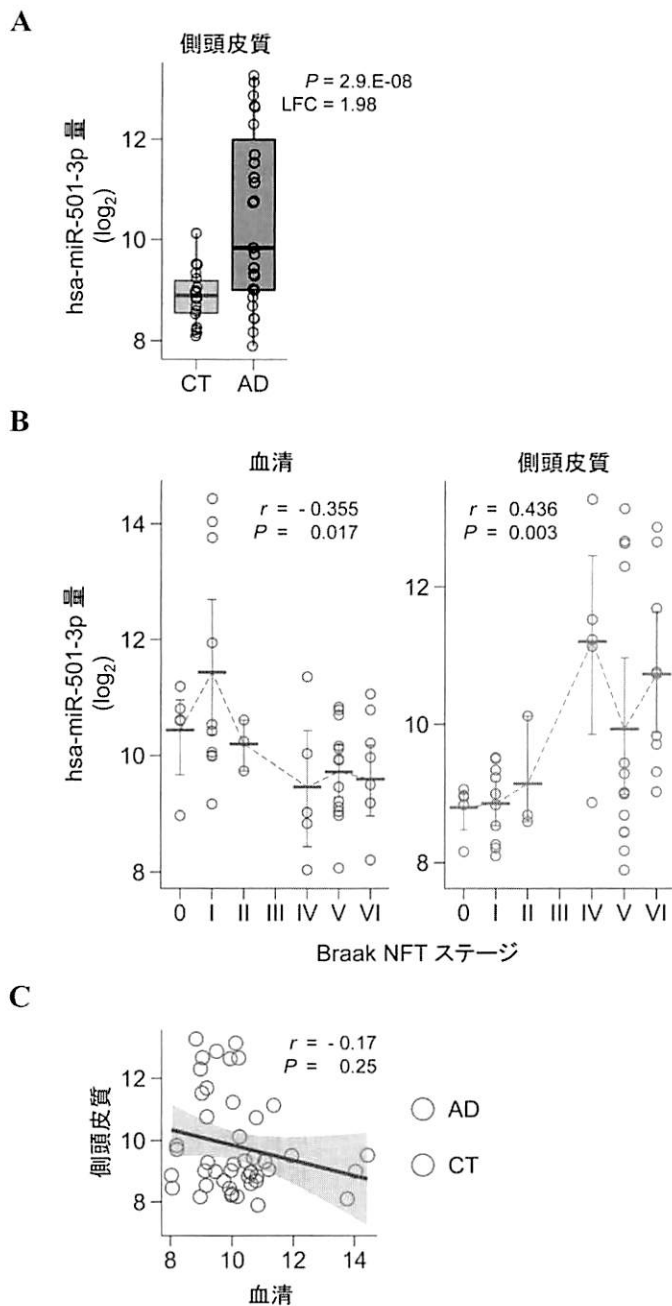


図3 同一被検者における脳内病理ステージに着目した脳内 hsa - miR - 501 - 3p の発現変動

(A) ROW 探索用サンプルセットにおいて hsa - miR - 501 - 3p は AD 患者の脳内で著しく増加していた。側頭葉皮質における hsa - miR - 501 - 3p を次世代シーケンサーにより解析した。次世代シーケンサーより得られた標準化リード数を log₂ スケールに変換後、箱ひげ図を用いて AD 群と対照群ごとに図示した。CT, 対照群; LFC, log₂ fold change; *P*, 多重検定補正のため Benjamini - Hochberg 法により調整された後の *P* 値。

- (B) ROW 探索用サンプルセットにおいて Braak NFT ステージと有意に相関する血清中もしくは脳内の hsa-miR-501-3p 量。血清中の hsa-miR-501-3p 量は Braak NFT ステージと負の相関関係にある一方 (スピアマンの順位相関係数 $r = -0.355, P = 0.017$), 脳内の hsa-miR-501-3p 量は正の相関関係を示した (スピアマンの順位相関係数 $r = 0.436, P = 0.003$)。次世代シーケンサーより得られた標準化リード数を log2 スケールに変換後, Braak NFT ステージを横軸にして図示した。太線は各 Braak NFT ステージにおける hsa-miR-501-3p 量の平均値を表す。エラーバーはそのステージにおける hsa-miR-501-3p 量の 95% 信頼区間を表す。
- (C) ROW 探索サンプルセットにおける同一検体内の血清中と脳内の hsa-miR-501-3p 量の関係。同一被検者の血清と脳組織との間に hsa-miR-501-3p は、有意ではなかったが負の相関傾向を示した (スピアマンの順位相関係数 $r = -0.17, P = 0.25$)。次世代シーケンサーより得られた標準化リード数を log2 スケールに変換後, 散布図を用いて図示した。横軸および縦軸はそれぞれ血清中または脳内の hsa-miR-501-3p 量を示す。

は、認知機能評価の指標である Mini-Mental State Examination score と有意に相関した ($r = 0.375, P = 0.007$; 図 2C)。hsa-miR-501-3p の receiver-operating characteristic 曲線解析による診断効率は、感度 53% および特異度 100% であった (area under the curve = 0.82; 図 2D)。これらの結果から、hsa-miR-501-3p が AD の臨床診断に応用できる新規の血清バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

脳内における hsa-miR-501-3p の変動

血清中の hsa-miR-501-3p 量の変動が脳内の hsa-miR-501-3p の発現量と関連するかどうかを調べるため、血清採取された同一被検者の脳内での hsa-miR-501-3p 量を解析した。ROW 探索用サンプルセットの被検者の側頭葉皮質より総 RNA を単離した。側頭葉皮質は AD の病理ステージ後半で強く傷害される脳部位である¹⁸⁾。単離された総 RNA は次世代シーケンサーを用いて解析し、AD 群と対照群との間で変動するマイクロ RNA を調べた。その結果、解析された 472 個のマイクロ RNA のうち 187 個が有意に変動していた (補正後 P 値 < 0.05)。187 個の中に hsa-miR-501-3p も含まれており、hsa-miR-501-3p は AD 群で著しく増加し、かつ 3 番目に強い有意差 (P 値) を示した (補正後 P 値 = 2.9×10^{-8} , log2 fold change = 1.98, 順位 = 3; 図 3A)。hsa-miR-501-3p は、死亡時年齢および性

別、APOE 遺伝型、RIN の補正をした検定でも有意に変動していた (補正後 P 値 = 0.0008, log2 fold change = 1.33, 順位 = 25; 表 3)。さらに、hsa-miR-501-3p 量は Braak NFT ステージと有意に相関していた (図 3B)。AD 病理が進行するにつれて脳内の hsa-miR-501-3p 量は増加していく一方 ($r = 0.436, P = 0.003$)、血清中の hsa-miR-501-3p 量は減少していく傾向が認められた ($r = -0.355, P = 0.017$)。また、hsa-miR-501-3p 量は、同一検体の脳内と血清中との間に、統計学的な有意差には至らなかったが負の相関傾向を示した ($r = -0.17, P = 0.25$; 図 3C)。これらの結果を合わせると、hsa-miR-501-3p は AD の脳内病理の進行に伴い同一被検者において血清中だけではなく脳内においても変動していることが示唆された。

培養細胞を用いた hsa-miR-501-3p の機能解析実験

AD 脳における hsa-miR-501-3p 増加の影響を明らかにするため、SH-SY5Y 細胞に合成 hsa-miR-501-3p を遺伝子導入し強制発現させた。SH-SY5Y 細胞より単離した総 RNA を次世代シーケンサーにより解析し、hsa-miR-501-3p によって制御されている遺伝子の同定を試みた。その結果、hsa-miR-501-3p の強制発現により 208 個の遺伝子が対照 (scramble control) に比べて有意に発現変動していた (補正後 P 値 $<$

表 3 ROW 探索サンプルセットにおいて同定された上位 30 個の側頭葉皮質変動マイクロ RNA

マイクロRNA	平均リード数	log2 fold change	補正前P値	補正後P値	順位
hsa-miR-1180-3p	8,753	1.09	5.9.E-09	1.4.E-06	1
hsa-miR-378a-3p	6,537	-0.60	3.0.E-09	1.4.E-06	1
hsa-miR-1249	6,632	1.22	1.4.E-08	2.2.E-06	3
hsa-miR-140-3p	37,115	-0.54	6.1.E-07	5.7.E-05	4
hsa-miR-204-3p	106	1.18	4.9.E-07	5.7.E-05	4
hsa-miR-92b-5p	284	1.14	7.2.E-07	5.7.E-05	4
hsa-miR-23a-3p	35,336	-0.94	9.6.E-07	6.5.E-05	7
hsa-miR-885-3p	268	1.21	1.2.E-06	7.0.E-05	8
hsa-miR-23b-3p	48,666	-0.92	1.6.E-06	8.3.E-05	9
hsa-miR-28-3p	13,920	-0.76	2.5.E-06	0.0001	10
hsa-miR-7704	528	1.13	2.3.E-06	0.0001	10
hsa-miR-877-5p	1,268	1.19	3.4.E-06	0.0001	12
hsa-miR-5100	244	1.39	4.5.E-06	0.0002	13
hsa-miR-504-3p	54	1.22	7.3.E-06	0.0002	14
hsa-miR-1247-5p	1,124	1.06	1.1.E-05	0.0003	15
hsa-miR-1343-3p	407	1.18	9.6.E-06	0.0003	15
hsa-miR-146b-5p	17,013	-1.15	1.1.E-05	0.0003	15
hsa-miR-1908-5p	258	1.03	1.2.E-05	0.0003	15
hsa-miR-223-3p	518	-1.12	1.0.E-05	0.0003	15
hsa-miR-409-5p	490	1.57	9.8.E-06	0.0003	15
hsa-miR-4510	378	1.20	1.1.E-05	0.0003	15
hsa-miR-744-5p	28,353	0.79	9.9.E-06	0.0003	15
hsa-miR-485-5p	5,420	0.72	2.5.E-05	0.0005	23
hsa-miR-532-5p	1,490	-0.64	3.4.E-05	0.0007	24
hsa-miR-501-3p	1,811	1.33	4.1.E-05	0.0008	25
hsa-miR-132-3p	14,406	-0.94	5.0.E-05	0.0009	26
hsa-miR-99a-3p	597	-0.48	4.9.E-05	0.0009	26
hsa-miR-6747-3p	68	0.71	5.6.E-05	0.0009	28
hsa-miR-766-3p	1,381	0.93	6.9.E-05	0.0011	29
hsa-miR-4787-3p	478	0.76	7.2.E-05	0.0011	30

略語：マイクロRNA, miRBase release 20に登録されている成熟マイクロRNAの名称; 平均リード数, 全検体における標準化リード数の平均値; log2 fold change, アルツハイマー病 (AD) 患者群と対照群との発現量の差。正の値はAD群で高いことを、負の値はAD群で低いことを示す; 補正前P値, 多重検定補正前のP値; 補正後P値, 多重検定補正のためBenjamini-Hochberg法により調整されたP値; 順位, 補正後P値による順位。

0.05; 表 4)。そのうち 128 遺伝子は発現量が減少しており, hsa-miR-501-3p 発現との関連が示唆された。これら 128 個の遺伝子が hsa-miR-501-3p によって直接的に発現が抑制されているかどうか調べるため TargetScan 7.1 を用いた解析を行った。TargetScan は、マイクロ RNA の配列

からアルゴリズムにより標的遺伝子を推測し、各マイクロ RNA の標的遺伝子を集積したデータベースである³⁵⁾。発現減少している 128 個の遺伝子のうち、123 遺伝子については TargetScan 7.1 に収載されており、そのうち 71 遺伝子は hsa-miR-501-3p が結合することが予測された

表4 培養細胞における hsa-miR-501-3p の強制発現で変動した上位20個の遺伝子

遺伝子	平均 リード数	log2 fold change	補正前 P値	補正後 P値	TargetScan	マイクロRNA	Prediction score
<i>CDK6</i>	4,627	-1.030	1.34E-27	1.70E-23	available	hsa-miR-501-3p	-0.458
<i>MYBL2</i>	6,525	-0.607	1.48E-21	9.41E-18	available	hsa-miR-501-3p	-0.376
<i>TOMM20</i>	18,819	0.534	1.14E-13	4.82E-10	available	NA	NA
<i>CLIC4</i>	6,984	-0.566	4.50E-13	1.43E-09	available	hsa-miR-501-3p	-0.469
<i>DIAPH1</i>	4,791	-0.460	6.10E-13	1.55E-09	available	hsa-miR-501-3p	-0.108
<i>MAPK6</i>	3,010	-0.477	1.61E-11	3.40E-08	available	NA	NA
<i>LOC221710</i>	1,719	-0.549	3.07E-11	5.57E-08	NA	NA	NA
<i>BCAT1</i>	9,714	-0.375	1.26E-10	2.00E-07	available	hsa-miR-501-3p	-0.192
<i>PHTF2</i>	3,257	-0.437	1.82E-10	2.57E-07	available	hsa-miR-501-3p	-0.255
<i>RRM2</i>	10,855	-0.440	5.92E-10	7.51E-07	available	NA	NA
<i>ADAMTS9</i>	5,509	-0.410	7.81E-10	9.01E-07	available	hsa-miR-501-3p	-0.184
<i>TMSB15A</i>	1,937	-0.497	8.62E-10	9.11E-07	available	hsa-miR-501-3p	-0.766
<i>GXYLT1</i>	2,250	-0.462	1.04E-09	1.02E-06	available	hsa-miR-501-3p	-0.195
<i>NXT2</i>	999	-0.560	4.32E-09	3.92E-06	available	hsa-miR-501-3p	-0.328
<i>CLN6</i>	1,612	-0.483	9.80E-09	8.29E-06	available	NA	NA
<i>G3BP2</i>	9,878	0.359	1.97E-08	1.56E-05	available	NA	NA
<i>B4GALT5</i>	4,784	-0.354	2.10E-08	1.57E-05	available	hsa-miR-501-3p	-0.532
<i>C14orf132</i>	9,457	0.466	3.23E-08	2.03E-05	available	NA	NA
<i>CDC6</i>	3,004	-0.413	3.27E-08	2.03E-05	available	NA	NA
<i>GNB1</i>	23,750	-0.295	3.01E-08	2.03E-05	available	hsa-miR-501-3p	-0.121

略語: 遺伝子, UCSC hg19 gtfファイルに記載されていた遺伝子名; 平均リード数, 全検体における標準化リード数の平均値; log2 fold change, hsa-miR-501-3p過剰発現群とscramble control群との発現量の差. 正の値はhsa-miR-501-3p過剰発現群で高いことを, 負の値はhsa-miR-501-3p過剰発現群で低いことを示す; 補正前P値, 多重検定補正前のP値; 補正後P値, 多重検定補正のためBenjamini-Hochberg法により調整されたP値; TargetScan, TargetScan 7.1において解析されていたか否かを表す; マイクロRNA, TargetScan 7.1においてhsa-miR-501-3pのその遺伝子への結合が予測されていたか否かを表す; Prediction score, TargetScan 7.1によって計算されたcumulative weighted context++ score. このスコアが低いほどマイクロRNAが結合する可能性が高いことを示す. 計4つのmRNA-Seqライブラリー(各条件において2サンプル)をシーケンスし, hsa-miR-501-3pにより制御されている遺伝子を同定した. 平均リード数が50以下の遺伝子は解析から除外し, 12,688遺伝子を検定した結果, 208遺伝子が有意となった(補正後P値 < 0.05).

(71/123 (58 %)). この割合は, mRNA-Seqで解析対象となった全遺伝子における割合よりも有意に高かった (1788/11483 (16 %), Fisher's exact test, $P < 9.7 \times 10^{-16}$). この結果は, 培養細胞実験でみられた遺伝子の発現変動が, hsa-miR-501-3pの強制発現により誘導されたことを支持する. 次に hsa-miR-501-3pの強制発現により変動

した遺伝子の生体内機能を明らかにするため, DAVID 6.8を用いた Gene Ontology 解析をおこなった. その結果, 発現が減少していた128個の遺伝子群には, DNA複製や細胞周期といった生体内作用に関連する遺伝子が有意に多く存在していた(表5). 一方, 発現が上昇していた80個の遺伝子群には有意なものは見出されなかった.

表 5 hsa-miR-501-3p の導入により有意に発現が減少した 128 個の遺伝子における Gene ontology 解析

ID	Term	遺伝子数	遺伝子	補正前 P 値	補正後 P 値
GO:0006271	DNA strand elongation involved in DNA replication	7	<i>MCM7, GINS4, PCNA, POLA2, MCM4, MCM5, FEN1</i>	9.9E-08	8.9E-05
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	10	<i>BCAT1, CDC6, MCM7, RRM2, PCNA, CDK6, POLA2, CDC45, MCM4, MCM5</i>	1.2E-06	5.5E-04
GO:0006270	DNA replication initiation	6	<i>CDC6, MCM7, GINS4, POLA2, MCM4, MCM5</i>	1.3E-06	0.0004
GO:0006260	DNA replication	9	<i>RECQL4, CDC6, MCM7, RRM2, KIAA0101, POLA2, MCM4, MCM5, FEN1</i>	3.8E-06	0.0009
GO:0000278	mitotic cell cycle	14	<i>CDC6, GINS4, CDK6, AURKB, POLA2, MYBL2, MCM4, MCM5, MCM7, RRM2, PCNA, PAFAH1B1, CDC45, FEN1</i>	9.4E-06	0.0017
GO:1990440	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to endoplasmic reticulum stress	4	<i>ATF4, ATF3, XBP1, HSPA5</i>	7.0E-05	0.0106
GO:0070059	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	5	<i>ATF4, XBP1, CHAC1, APAF1, PMAIP1</i>	7.1E-05	0.0091

略語: ID, Gene Ontology ID; Term, Gene Ontology のカテゴリー GOTERM_BP_DIRECT における生体内作用の名前; 遺伝子, 発現変動していた 128 個の遺伝子のうち、その生体内作用に関係していた遺伝子; 補正前 P 値, 多重検定補正前の P 値; 補正後 P 値, 多重検定補正のため Benjamini-Hochberg 法により調整された P 値. 補正後 P 値が 0.05 未満の有意な生体内作用を記載した.

考 察

脳内における老人斑および神経原線維変化の形成と、脳脊髄液中における A β およびタウタンパクの変動とは密接な関係があることが知られて

おり、脳脊髄液中の A β およびタウタンパク測定は、AD の臨床診断に有用なバイオマーカーとなっている。本研究において、hsa-miR-501-3p と AD に関連する幾つかの知見が得られた。まず、hsa-miR-501-3p は AD の進行に伴って変動し、

その量的変動は同一検体の脳内と末梢血中との間で関連していることを見出した。ROW探索用サンプルセットのAD群において、血清中の hsa-miR-501-3p 量が減少している一方、脳内では著しく増加していた。2つ目に、血清中と脳内の両方とも hsa-miR-501-3p 量は Braak NFT ステージと有意に相関していた。3つ目に、同一検体内において両者の間に負の相関がみられた。最後に、血清 hsa-miR-501-3p の量的変動は、臨床診断により構成される NIG 検証サンプルセットでも再現性が得られた。これらの結果から、血清 hsa-miR-501-3p は AD の有望なバイオマーカーであり、その量的変動は脳内での AD 病理の進展に対応していることが示唆された。但し、ROW探索用サンプルセットの血清採取と剖検施行までの間には最大2週間の時間差があるため、採血時の容態など血清のマイクロRNAに及ぼす交絡因子が存在する可能性には留意が必要と思われる。

末梢血中における hsa-miR-501-3p の変動は AD を含めた神経変性疾患では報告されていない。おそらくこれは、RNA抽出時の手法の違いや³⁶⁾³⁷⁾、定量方法の違い³⁸⁾、抽出試料の違い(血漿か血清か全血か)などの技術的差異に由来していると考えられる。例えば、血球より得られるマイクロRNAの収量は、血球成分のない血漿や血清の収量よりもはるかに多い³⁸⁾。したがって、全血サンプルや溶血により血球成分が混入しているサンプルを用いた場合には、異なるマイクロRNAが変動する可能性がある。本研究において hsa-let-7f-5p および hsa-miR-26b-5p は AD 患者の血清中で増加していたが、全血サンプルを用いた Leidinger らの解析では、それらのマイクロRNAは AD 患者で減少していた¹⁴⁾。解析する試料の違いにより一致しない結果が導かれる可能性がある。マイクロRNAバイオマーカーの再現性を得るためには、統一化されたプロトコルに準じて試料を収集することが重要であろう。

一方、脳内においても hsa-miR-501-3p の脳疾患に関連した変動は報告されていない。これは、使用した剖検脳サンプルの Braak NFT ステージの違いに起因していると思われる。本研究の

ROW探索用サンプルセットにおける次世代シーケンサー解析によれば、脳内の hsa-miR-501-3p 量は Braak NFT ステージの進展に伴い単純に増加していくわけではない。例えば、Braak NFT ステージ V で一時的な減少傾向が見られる(図3B)。したがって、どの Braak NFT ステージを AD または対照群として活用するかによって、得られる結果が変化する可能性がある。その一方で、本研究の次世代シーケンサー解析は、過去に報告されているマイクロRNAの変動と一致した結果も得られている(例えば miR-107³⁹⁾, miR-125b⁴⁰⁾, miR-132/212 クラスター⁴¹⁾⁻⁴³⁾)。Lau らが示唆しているように⁴¹⁾、Braak NFT ステージごとのマイクロRNAの変動パターンについて、さまざまな脳部位に由来する剖検脳サンプルを多数解析し明らかにしていく必要があるだろう。

脳内における hsa-miR-501-3p 量の増加は AD 病理にどういった影響を与えているのであろうか。本研究の培養細胞を用いた実験結果によれば、hsa-miR-501-3p の増加は AD 脳における細胞周期の異常に関与している可能性が示唆される。培養細胞に hsa-miR-501-3p を導入した結果、128 個の遺伝子の発現量が抑制された。これら 128 遺伝子の中には、DNA複製や細胞周期といった生体内機能に関与する遺伝子が有意に多く存在していた(表5)。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、老人斑や神経原線維変化の形成よりも先行する AD 脳における初期イベントであることが既報の研究により指摘されている⁴⁴⁾⁻⁴⁹⁾。また、別の機序も考えられる。Hu らはラットの脳組織を使用し、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、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 miR-501-3p が関与することを報告している⁵⁰⁾。

本研究により AD に対する新規の血清バイオマーカー候補となりうる hsa-miR-501-3p を同定した。血清中の hsa-miR-501-3p 量の減少は AD 脳での著しい増加と関連しており、この増加は、

神経細胞における細胞周期の変調などのAD発症機序に関与している可能性が示唆された。しかしながら、hsa-miR-501-3pがAD病態に及ぼす影響については不明な点が多く残されており、今後さらなる解析が必要である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり病理解剖および神経病理学的診断をされた東京都健康長寿医療センターの村山繁雄先生、初田裕幸先生、国立精神・神経医療研究センターの齊藤祐子先生に深謝いたします。本研究の御指導をいただきました新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野の池内 健先生、桑野良三先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Prince M, Bryce R and Ferri C: World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention. *Alzheimer's Disease International* 2011.
- 2) Blennow K, Hampel H, Weiner M and Zetterberg H: Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6: 131 - 144, 2010.
- 3) Cummings JL: Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimers Dement* 7: e13 - e44, 2011.
- 4) Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, Blennow K, Lönneborg A, Wyss - Coray T, Soares H, Bazenet C, Sjögren M, Hu W, Lovestone S, Karsdal MA, Weiner MW; Blood - Based Biomarker Interest Group.: The future of blood - based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10: 115 - 131, 2014.
- 5) Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281 - 297, 2004.
- 6) Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215 - 233, 2009.
- 7) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova - Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB and Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood - based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10513 - 10518, 2008.
- 8) Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT and Chan C: Blood serum miRNA: non - invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 235: 491 - 496, 2012.
- 9) Tan L, Yu JT, Tan MS, Liu QY, Wang HF, Zhang W, Jiang T and Tan L: Genome - wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 40: 1017 - 1027, 2014.
- 10) Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, Villemagne VL, Fowler CJ, Rembach A, Martins RN, Rowe CC, Macaulay SL, Masters CL, Hill AF; Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group.: Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol Psychiatry* 20: 1188 - 1196, 2015.
- 11) Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, Bernier F, Yanagimachi M, Aoshima K and Oda Y: Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* 8: e69807, 2013.
- 12) Sheinerman KS, Tsvinsky VG, Abdullah L, Crawford F and Umansky SR: Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study. *Aging (Albany NY)* 5: 925 - 938, 2013.
- 13) Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG and Smalheiser NR: Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One* 10: e0139233, 2015.
- 14) Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJ, Meder B, Bartfai T, Meese E and Keller A: A blood based 12 - miRNA signa -

- ture of Alzheimer disease patients. *Genome Biol* 14: R78, 2013.
- 15) Hébert SS, Horr  K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A and De Strooper B: Loss of microRNA cluster miR - 29a/b - 1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta - secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6415 - 6420, 2008.
 - 16) Nunez - Iglesias J, Liu CC, Morgan TE, Finch CE and Zhou XJ: Joint genome - wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 5: e8898, 2010.
 - 17) Geekiyanage H and Chan C: MicroRNA - 137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid β , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31: 14820 - 14830, 2011.
 - 18) Braak H and Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer - related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239 - 259, 1991.
 - 19) Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H and Del Tredici K: Staging of Alzheimer disease - associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112: 389 - 404, 2006.
 - 20) McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D and Stadlan EM: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS - ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939 - 944, 1984.
 - 21) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y: Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease.: Dynamin - binding protein gene on chromosome 10q is associated with late - onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15: 2170 - 2182, 2006.
 - 22) Martin M: Cutadapt removes adapter sequences from high - throughput sequencing reads. *EMBnet* 17: 10 - 12, 2011.
 - 23) Langmead B, Trapnell C, Pop M and Salzberg SL: Ultrafast and memory - efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25, 2009.
 - 24) Anders S, Pyl PT and Huber W: HTSeq - a Python framework to work with high - throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166 - 169, 2015.
 - 25) Kozomara A and Griffiths - Jones S: miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: D68 - D73, 2014.
 - 26) Love MI, Huber W and Anders S: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA - seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550, 2014.
 - 27) Benjamini Y and Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57: 289 - 300, 1995.
 - 28) Zanutto S, Pizzamiglio S, Ghilotti M, Bertan C, Ravagnani F, Perrone F, Leo E, Pilotti S, Verderio P, Gariboldi M and Pierotti MA: Circulating miR - 378 in plasma: a reliable, haemolysis - independent biomarker for colorectal cancer. *Br J Cancer* 110: 1001 - 1007, 2014.
 - 29) Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Valley MP, van Zandwijk N and Reid G: Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 6: e24145, 2011.
 - 30) Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25: 402 - 408, 2001.
 - 31) Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR: STAR: ultrafast universal RNA - seq aligner. *Bioinformatics* 29: 15 - 21, 2013.
 - 32) Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA: Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat*

- Protoc 4: 44 - 57, 2009.
- 33) Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA: Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37: 1 - 13, 2009.
- 34) Murayama S and Saito Y: Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology* 24: 254 - 260, 2004.
- 35) Agarwal V, Bell GW, Nam JW and Bartel DP: Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4: e05005, 2015.
- 36) Li Y and Kowdley KV: Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem* 431: 69 - 75, 2012.
- 37) Crossland RE, Norden J, Bibby LA, Davis J and Dickinson AM: Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *J Immunol Methods* 429: 39 - 49, 2016.
- 38) Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D and Galas DJ: Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 7: e41561, 2012.
- 39) Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I and Nelson PT: The expression of microRNA miR - 107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta - site amyloid precursor protein - cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 28: 1213 - 1223, 2008.
- 40) Banzhaf - Strathmann J, Benito E, May S, Arzberger T, Tahirovic S, Kretzschmar H, Fischer A and Edbauer D: MicroRNA - 125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *EMBO J* 33: 1667 - 1680, 2014.
- 41) Lau P, Bossers K, Janky R, Salta E, Frigerio CS, Barbash S, Rothman R, Sierksma AS, Thathiah A, Greenberg D, Papadopoulou AS, Achsel T, Ayoubi T, Soreq H, Verhaagen J, Swaab DF, Aerts S and De Strooper B: Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 5: 1613 - 1634, 2013.
- 42) Wong HK, Veremeyko T, Patel N, Lemere CA, Walsh DM, Esau C, Vanderburg C and Krichevsky AM: De - repression of FOXO3a death axis by microRNA - 132 and - 212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 22: 3077 - 3092, 2013.
- 43) Smith PY, Hernandez - Rapp J, Jolivet F, Lecours C, Bisht K, Goupil C, Dorval V, Parsi S, Morin F, Planel E, Bennett DA, Fernandez - Gomez FJ, Sergeant N, Buée L, Tremblay M^l, Calon F and Hébert SS: miR - 132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Hum Mol Genet* 24: 6721 - 6735, 2015.
- 44) Chow HM and Herrup K: Genomic integrity and the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 16: 672 - 684, 2015.
- 45) Absalon S, Kochanek DM, Raghavan V and Krichevsky AM: MiR - 26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau - phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *J Neurosci* 33: 14645 - 14659, 2013.
- 46) Bonda DJ, Lee HP, Kudo W, Zhu X, Smith MA and Lee HG: Pathological implications of cell cycle re - entry in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 12: e19, 2010.
- 47) Swerdlow RH: Alzheimer's disease pathologic cascades: who comes first, what drives what. *Neurotox Res* 22: 182 - 194, 2012.
- 48) Frade JM and Ovejero - Benito MC: Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle* 14: 712 - 720, 2015.
- 49) Kruman II, Wersto RP, Cardozo - Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M and Mattson MP: Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41: 549 - 561, 2004.
- 50) Hu Z, Zhao J, Hu T, Luo Y, Zhu J and Li Z: miR - 501 - 3p mediates the activity - dependent regulation of the expression of AMPA receptor subunit GluA1. *J Cell Biol* 208: 949 - 959, 2015.