

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23957

研究課題名(和文)細胞外RNAの編集率を指標とした筋萎縮性側索硬化症の新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)The Development of biomarker for amyotrophic lateral sclerosis by measuring editing efficiency on extracellular RNA

研究代表者

保坂 孝史(Takashi, Hosaka)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00847890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：髄液中の細胞外RNAの抽出法をTrizol法とカラム抽出法で比較し、Trizolを用いてtotal RNAを抽出する方がより多くのRNA量を回収でき、その量は髄液1ml中には900pg程度であることを見出した。抽出したtotal RNAより既に同定している運動ニューロンに発現しADAR2依存性編集部位を持つmRNAの検出を行った。そのうち、あるADAR2依存性編集部位では対照群でほとんどが編集型であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、髄液中に存在するRNAの編集率を測定することで筋萎縮性側索硬化症の診断を可能にする。現在このRNA編集異常を標的とした種々の治療法が開発が進んでおり、その治療と組み合わせることで筋萎縮性側索硬化症が治療可能な疾患になる可能性がある。また、髄液中に存在するRNAの編集率測定法を確立することで、他のRNA編集異常が関与している疾患のバイオマーカーの確立にも応用できる。

研究成果の概要(英文)：I measured the total RNA levels of cerebrospinal fluid(CSF) using TRIzol Reagent and the total RNA levels of CSF were approximately 900pg. Moreover, I detected some mRNAs that were expressed in motor neuron and included ADAR2 dependent sites, and I measured the editing efficiencies at the ADAR2 dependent sites in CSF. I detected editing efficiency at one ADAR2 dependent site were high in CSF derived from control patients.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 RNA編集 バイオマーカー ADAR2 細胞外RNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 孤発性 ALS のバイオマーカー

孤発性 ALS の病態解明が進み、多くの治療候補薬が出てきている。しかしながら、*in vitro* や動物実験レベルで得られた効果の確証に重要な、診断および治療モニタリングを可能にするバイオマーカーは存在しない。現在、ALS の診断には、神経学的診察と電気生理学検査を組み合わせた El Escorial 分類や Awaji 基準が用いられ、種々の臨床試験で使用されているが、ALS と診断されたうち 6~10% が他疾患であった。また、臨床試験の治療評価に ALS 機能評価スケール(ALSFRS-R)が用いられているが、治療評価をより鋭敏かつ正確に評価するには、新たな治療モニタリングのバイオマーカーが必要である。

### (2) 孤発性 ALS の疾患特異的な分子異常

孤発性 ALS の運動ニューロン死に、AMPA 受容体を介した異常な  $Ca^{2+}$  流入が関与している (Hideyama & Kwak, *Front Mol Neurosci* 2011)。この異常な  $Ca^{2+}$  流入は受容体のサブユニットの一つである GluA2 の Q/R 部位の RNA 編集の有無により決定づけられる。正常状態では、運動ニューロンではその全てが編集されており、 $Ca^{2+}$  非透過性の AMPA 受容体のみを発現している。私たちは、孤発性 ALS では未編集型の GluA2 が発現しており、その特異的な編集酵素である ADAR2 の発現量が低下していることを世界で初めて発見した (Kawahara, et al, *Nature* 2004; Hideyama et al, *Neurobiol Dis* 2012)。そして、この分子異常は、下位運動ニューロンに特異的に起こっており、他の神経変性疾患では認められなかった。また、ALS の病理学的診断指標である transactive response DNA/RNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) の細胞内局在異常は、ADAR2 の発現量が低下した下位運動ニューロンでのみ認められた (Aizawa et al, *Acta Neuropathol* 2010)。以上より、ADAR2 の発現量低下による Q/R 部位未編集型 GluA2 の出現を発端とする異常は、ALS に特異的な分子異常であるといえる (図 1)。

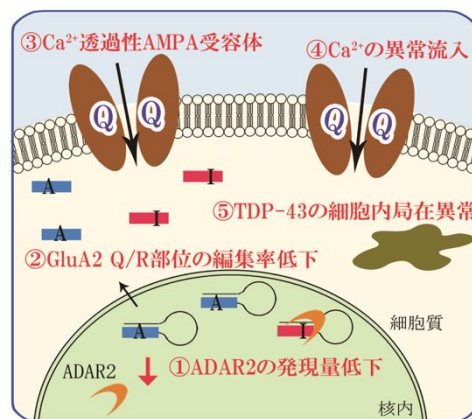


図 1

### (3) バイオマーカーの可能性を秘めた細胞外 RNA

近年、細胞外に存在しながらも細胞内の環境を反映している細胞外 RNA はバイオマーカー候補とされる。私は、*in vitro* で、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量と相関することを世界で初めて発見した (Hosaka et al, *Neurosci Res* 2018)。孤発性 ALS の疾患特異的な分子異常である ADAR2 の発現量低下を反映する細胞外 RNA は、疾患特異的なバイオマーカーとなり得る。

## 2. 研究の目的

加齢が危険因子である ALS は、患者数の増加が予想され、根本的な治療法の開発が望まれる。そのため、診断および治療モニタリングを可能にするバイオマーカーの開発は必須である。本研究の目的は、採取可能な体液中に存在する RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率を測定し、運動ニューロンでの ADAR2 の発現量低下を同定し、診断および治療モニタリングのバイオマーカーを開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 髄液中の細胞外 RNA の抽出

髄液より total RNA を抽出し、DNaseI 処理および RNA 精製を行う。ALS 患者と対照群の細胞外 RNA 量を、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) を用いて評価する。

### (2) 体液中の細胞外 RNA の編集率測定

逆転写反応を行い、total RNA を鋳型とする cDNA を作製し、それをテンプレートとして Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応を行う。また、一部の mRNA に関しては、RT-PCR を行い逆転写の段階から目的の mRNA のみを増幅させる。PCR 産物を DNA 精製し、以下に記載するように編集率の測定を行う。PCR 産物の制限酵素による切断部位が RNA 編集の有無で異

なる場合は、Bioanalyzer 2100 を用いて、出現する目的の位置の DNA 量の比率から編集率を測定する。制限酵素による切断部位が RNA 編集の有無で変化しない場合は、サンガーシーケンスを行い、グアノシンとアデノシンのピークの比率から編集率を測定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 髄液中に存在する細胞外 RNA

ALS は運動ニューロンが特異的に変性する疾患であり、運動ニューロンでの編集率変化を細胞外 RNA で見出すことが重要である。つまり、中枢神経由来である髄液中の細胞外 RNA 中の、上記に示した ADAR2 依存性編集部位の編集率変化は、運動ニューロンでの ADAR2 発現量低下を反映するバイオマーカーになり得る。

種々の試薬を用いて髄液中から抽出できる RNA 量の比較を行い、最適な細胞外 RNA の抽出法を同定し、その量を評価することに成功した。そして、髄液 1ml から抽出した細胞外 RNA 量は 900pg 程度であり、非 ALS 患者と ALS 患者で有意な差は認めなかった(図 2)。

また、ALS 群では髄液中の total RNA 量と ALS 機能スケールである ALSFRS-R との間に相関は認めなかった(図 3)。

そして、非 ALS 患者の髄液中で上記の候補編集部位を検出することに成功し、その編集率を測定したところ、ある mRNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率が全ての症例で高かった(図 4)。

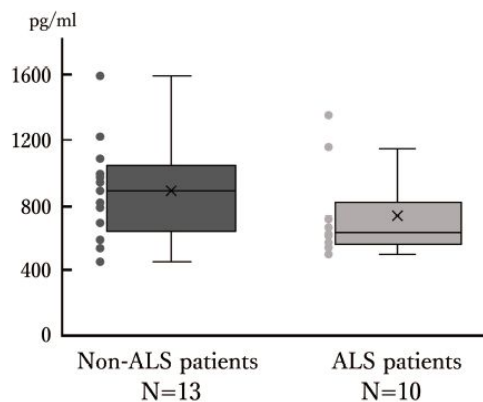


図 2

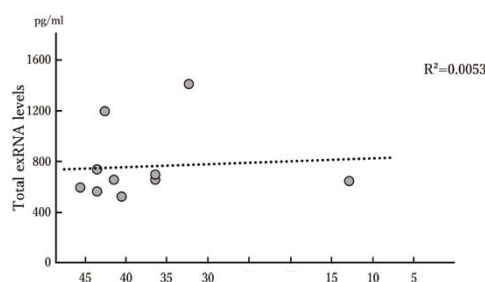
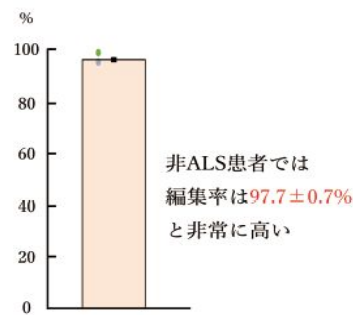


図 3

運動ニューロンで ADAR2 発現量が低下している孤発性 ALS 患者では、中枢神経由来である髄液中の ADAR2 依存性編集部位の編集率が低下している可能性が高く、今後の検討に非常に期待がもてる。

なお、これらの成果は、ポスター発表(第 61 回日本神経学会学術大会および第 62 回日本神経学会学術大会)で報告している。また、孤発性 ALS と RNA メタボリズムの関連、および ALS のバイオマーカー候補については種々の論文で総説している(Hosaka et al, Int J Mol Sci 2019; 保坂孝史、郭伸, 医学の歩み, 2020)。



非ALS患者では編集率は97.7±0.7%と非常に高い

N = 5(脊髄梗塞、正常圧水頭症、視神経脊髄炎、脊髄炎、核内封入体病) 平均値±標準誤差

図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hosaka T, Yamashita T, Tamaoka A, Kwak S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Extracellular RNAs as Biomarkers of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 3148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20133148.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保坂 孝史, 山下 雄也, 寺本 さやか, 玉岡 晃, 郭 伸
2. 発表標題 ADAR2 downregulation is a cause of death not only in ALS motor neurons but also in cultured cells
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保坂孝史, 辻浩史, 寺田真, 山下 雄也, 寺本 さやか, 富所康志, 石井亜紀子, 中馬越清隆, 石井一弘, 玉岡 晃, 郭 伸
2. 発表標題 Total extracellular RNA levels in cerebrospinal fluid derived from amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 保坂孝史, 郭伸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 筋萎縮性側索硬化症 RNAメタポリズムの観点からみたバイオマーカーおよび治療の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------