

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07805

研究課題名（和文）血中エクソソームmicroRNAに着目した認知症の予測・診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for predicting and diagnosing dementia focusing on blood exosome microRNA

研究代表者

外山 研介（Toyama, Kensuke）

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60793346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血液脳関門の破綻が認知症の病態と関連することに着目し、microRNAを活用した診断バイオマーカーの有用性を検証しました。miR-511-3pは有効な診断マーカーにはなりにくいと考えられましたが、miR-501-3pは動脈硬化と軽度認知機能障害の指標となり得ることが示されました。具体的には、血中エクソソームmiR-501-3pレベルが高いと動脈硬化の進行度が高く、軽度認知機能障害も多く検出できました。今回の検討により、血中エクソソームmicroRNA値が認知症の診断マーカーとして有用である可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化や軽度認知機能障害の有用なヒトバイオマーカーである可能性を示した点は学術的に重要です。これにより、新たな診断法や治療法の開発に寄与することが期待されます。また、血液検査が認知症の早期発見と予防に役立つ可能性があり、非侵襲的な検査法として普及すれば、患者の負担を軽減し、医療コストの削減にも寄与する社会的な意義があります。

研究成果の概要（英文）：We focused on the association between blood-brain barrier disruption and the pathology of dementia, and evaluated the utility of microRNA as diagnostic biomarkers. While miR-511-3p was found to be unlikely to serve as an effective diagnostic marker, miR-501-3p showed potential as an indicator of both arteriosclerosis and mild cognitive impairment. Specifically, high levels of blood exosomal miR-501-3p were associated with greater progression of arteriosclerosis and more frequent detection of mild cognitive impairment. This investigation suggests that blood exosome microRNA levels could become useful diagnostic markers for detecting dementia.

研究分野：血管生物学

キーワード：microRNA 血管性認知機能障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門は血管内皮細胞と近接するアストロサイトや神経細胞などの多種細胞同士のクロストークにより調整されており、とりわけ脳血管内皮細胞のタイトジャンクションが基盤となっており、そのバリア機能は形成されている。これまでの我々の検討により、脳の毛細血管の機能破綻によるタイトジャンクションの機能不全に端を発したバリア機能の破綻は、認知症の病態の悪化と深く関わっていることが明らかとなっている (Toyama K, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38:1392. 2018, Toyama K, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;34:616. 2014)。

ヒトの軽度認知機能障害者でも海馬領域や脳白質部に血液脳関門の破綻が思ったよりも早期から出現していることが、特殊な画像検査等からも近年明らかとなりつつある (*Neuron* 85: 296. 2015, *Neurology* 92: e1669. 2019)。しかし、血液脳関門の破綻が認知症の予後や病勢にどの程度寄与しているのかについては十分に検証されていない (*Nat Rev Dis Primers.* 4: 18003. 2018)。これは、実臨床において血液脳関門破綻の状態を簡易に評価する手段が限られており、脳 MRI 検査や脳血流シンチグラフィといった特殊な画像検査が一般的であるため、検査に費やす時間や手間・費用を考えると、患者にかかる負担が大きく、現実には画像検査を行うことは稀であるからだと考えられる。

我々は、認知症を血管疾患の延長と捉え、タイトジャンクション、つまり血液脳関門破綻に着目した病態メカニズムのさらなる解明を足がかりに、認知症の新たな診断方法や血液脳関門破綻を標的とした新たな作用機序による創薬開発に挑戦したいと考えて研究をスタートした。

2. 研究の目的

認知症の病態と血液脳関門の破綻の関係性をより簡便に検証することのできるバイオマーカーの確立を研究目標とし、すでに動物実験で認知機能障害との関係性を見出している miR-501-3p に加え、検討余地のあった miR-511-3p の有益性について基礎的・臨床学的な検証を行うこととした。既知の「miR-501-3p」と「miR-511-3p」とのコンビネーション診断バイオマーカーにより、microRNA の低特異性の問題を回避した、高精度で特異的なマーカーの創出に結びつくと期待された。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞実験

ヒト hCMEC/D3 細胞へ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen 社) を用いて has-miR-511-3p の miRNA mimic と (pre-miR; GeneDesign 社) inhibitor (anti-miR; GeneDesign 社) をトランスフェクションした。その後、目的の遺伝子の発現量を評価するために QIAzol Reagent (QIAGEN 社) を用いて細胞を回収した。

(2) 血液エクソソーム中の RNA 抽出

exoRNeasy (QIAGEN 社) を用いて血液 (血清、血漿) より RNA を抽出した。血液中エクソソームには信頼に足る内部標準がないため、抽出の過程で外部標準である *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39) miRNA mimic (Spike-In Control; Catalog no. 219610; Qiagen) を添加した。

(3) 定量 Real time PCR

Large RNA の遺伝子発現評価については、DNase 処理後に Rever Tra Ace (TOYOBO 社) を用いて cDNA へと逆転写した。各プライマーを用いて THUNDERBIRD SYBR Green (TOYOBO 社) でリアルタイム PCR を施行した。また、microRNA の発現評価については、TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用し、miRNA を Reverse Transcript しました。hsa-miR-501-3p (Applied Biosystems) および cel-miR-39 (Applied Biosystems) の TaqMan Assay Kits (Applied Biosystems) を使用した。

4. 研究成果

血液エクソソーム microRNA が簡便で速さが求められる実臨床で使えるようになるためには様々な課題がある。特に特異性の問題は重要で、microRNA が複数の遺伝子発現を制御できるという点が完全に裏目に出ることになる。このため、認知症の疾患マーカーとしてどこまで特異性を保てるのかという課題が常に残り、疾患バイオマーカーとして microRNA が今後利用されるためには、複数の microRNA の組合せなどでの検証も重要であると考えられた。このため、miR-501-3p と miR-511-3p の両方にその活路を期待して研究をスタートした。

認知機能障害が生じた脳内で発現が増える可能性が高い候補 microRNA を複数見出している (Toyama K et al. Pharmacological Research 146:104266. 2019)。そのうちの一つである miR-511-3p の制御遺伝子を同定するために、バイオインフォマティクスなどの情報科学を駆使し、数十種類の候補制御遺伝子を絞り込んだ (図 1A & I [各遺伝子名は秘匿化])。しかし、その後行った *in vitro* の検討では、miR-511-3p を過剰発現させてもいずれの候補遺伝子も変動がなく (図 1B~H, J~L)、血液脳関門破綻の制御に関与できる miR-511-3p の制御遺伝子の同定には辿り着かず、miR-511-3p は認知症の予測や診断法の開発に結びつく有用な標的 microRNA ではない可能性が高いと考えるに至った。

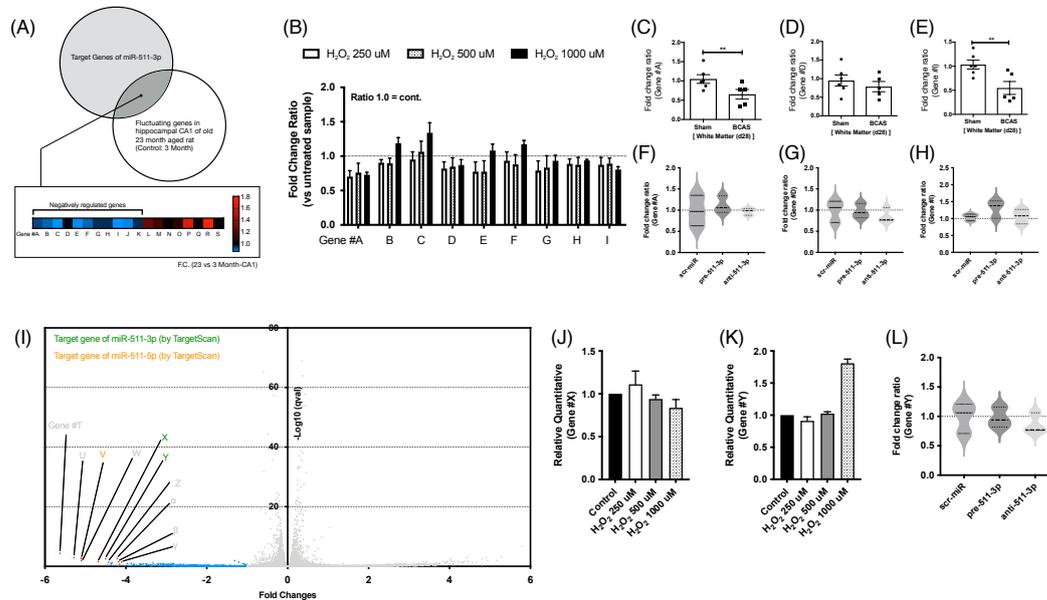


図 1 : (A) 老齢マウスの脳海馬 (CA1) 領域で変動する遺伝子群と miR-511-3p の制御候補遺伝子群のうち重複した遺伝子発現 MAP。このうち、Negatively regulated が標的とすべき遺伝子である。(B) has-miR-511-3p 発現のトリガー因子である過酸化水素水をヒト脳血管内皮細胞 (hCMC/D3 細胞) へ刺激した際に (A) で同定した Negatively regulated Gene の遺伝子発現の濃度依存性変化の検証。(C~E) (B) より has-miR-511-3p の候補制御遺伝子と考えられた Gene #A, D & I について、認知症モデルマウス (BCAS マウス) の脳梁白質部における変化を検証した。(F~H) hCMC/D3 細胞において has-miR-511-3p を over/under-express した際の候補制御遺伝子 Gene #A, D & I の遺伝子発現評価。(I) 公共データベースを利用して、バイオインフォマティクスにより過酸化水素水を刺激した際に変動する遺伝子群を解析し、Volcano Plot を作成した。Gene #X と #Y は has-miR-511-3p が制御することが可能であることがその後の *in silico* 解析で導き出された。(J & K) 過酸化水素水を hCMC/D3 細胞へ刺激した際に (I) で同定した has-miR-511-3p の候補制御遺伝子 Gene #X & Y の変化。(L) hCMC/D3 細胞において has-miR-511-3p を over/under-express した際の Gene #Y の遺伝子発現を評価。

一方、我々は人間ドック受診者のデータを用いて、血中エクソソーム由来の miR-501-3p と動脈硬化の関連性について調べた。miR-501-3p と脈波伝搬速度 (動脈硬化の進展度) は正の相関を示し、ROC カーブから求めたカットオフ値で miR-501-3p 発現値の高低で分けると、miR-501-3p 高値者は脈波伝搬速度が高く (図 3 : 左側)、「動脈硬化有り (PWV 値 > 1500cm/s)」と判定される割合も多かった (図 3 : 右側)。メカニズムはまだ不明な点が多いが、血管障害と miR-501-3p には ZO-1 以外のところでも強い結びつきがあるものと考えられた。

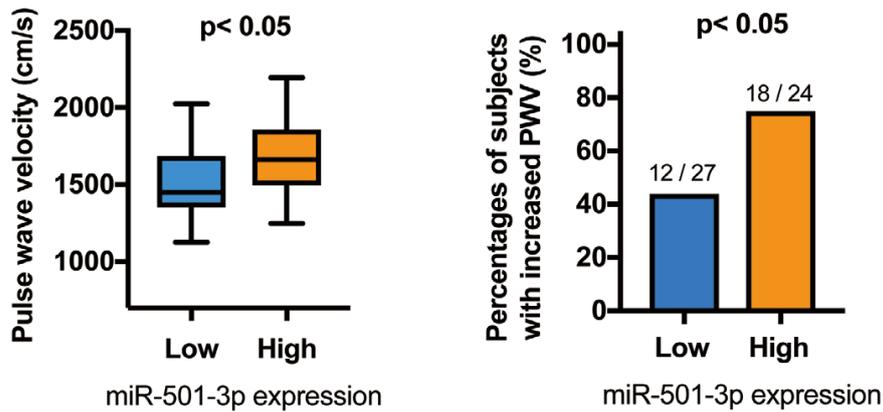


図3：miR-501-3p 低値群 (Low) と高値群 (High) において、PWV 値 (左側) と動脈硬化と判定された人の割合の違い (主な発表論文の文献-1. より引用)

よって、血管障害を伴う認知症を分別できるマーカーになり得る可能性も考え、続いて、血中エクソソーム miR-501-3p に着目して認知機能悪化の程度や血液脳関門破綻の程度との関係性について解析を進め、既知の miR-501-3p に予測や診断法の開発に結びつく有用な臨床的意義の有無について検討を進めることとした。

近年の画像診断精度の向上によって、血管性軽度認知機能障害者の脳梁白質部で血液脳関門の破壊がしばしば認められることが明らかとなっている。血液脳関門破綻による白質病変で生じる認知機能低下に miR-501-3p が鍵因子であることを動物実験で我々は証明してきた (Toyama K, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38:1392. 2018)。このため、初期段階の血管性軽度認知機能障害者では血中エクソソーム miR-501-3p の発現が高まっている可能性があるかと仮定し、178名の被験者 (年齢 73 歳 [68-75 歳]、男性 53%) を対象に血中 miR-501-3p 値と軽度認知機能障害の関係性について調査した。なお、軽度認知機能障害の判定は、日本版 MoCA-J スコアを用い、血清エクソソーム中の miR-501-3p の発現値は qPCR 法で計測した。また、研究当初予定していた血液サンプルは、サンプル保存施設から遠くに位置する健診施設で採取されていました。採取施設から保存施設までの距離があり、凍結保存までに長時間を要するため、不安定な RNA の解析をするサンプルとして十分でないと考えられた。そのため、保存施設に近いローカルエリアである東温市で採取された血液サンプルを用いて解析を行った。

miR-501-3p の ΔCt 値が ROC 曲線から導き出されたカットオフレベルより上 (高値群; n=74) または下 (低値群; n=104) にあるかによって二群に分けた。この結果、認知機能障害者は miR-501-3p が高いグループで有意に多く検出された (図4: 低値群 47.1% vs. 高値群 63.5%; $p < 0.05$)。

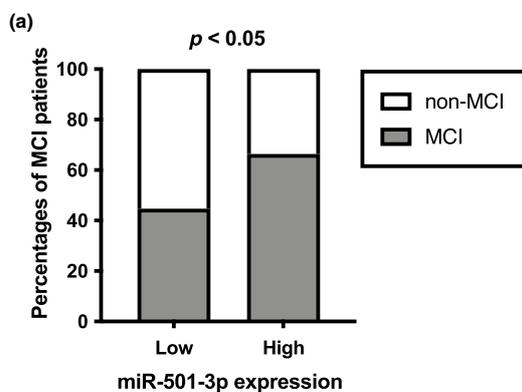


図4：miR-501-3p 低値群 (Low) と高値群 (High) における軽度認知障害者の占める割合 (主な発表論文の文献-2. より引用)

多変量ロジスティック回帰分析でも、miR-501-3p 高値群で軽度認知機能障害者は低値群と比べて2.662倍も多く検出された(表1)。なお、非糖尿病患者では、miR-501-3p 高値群で認知機能障害がオッズ比3.633倍も多く検出され、動脈硬化症のある患者でもmiR-501-3p 高値群では低値群と比べて軽度認知機能障害は3.219倍多く検出された。これらの解析から、血中エクソソームmiR-501-3pの単独測定でも、血管性軽度認知機能障害を判定するに十分な指標になり得ると考えられた。

All patients (n=178)	Univariate		Multivariate					
	OR (95% CI)	p value	Model-1 (Hosmer-Lemeshow test; p=0.64)		Model-2 (Hosmer-Lemeshow test; p=0.17)		Model-2; based on 1000 bootstrap replications	
			OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value	95% CI	p value
Age, years	1.023 (0.964-1.086)	0.448	1.017 (0.956-1.082)	0.598	1.050 (0.982-1.123)	0.155	-0.019-0.140	0.195
Gender, male	1.286 (0.712-2.323)	0.405	0.811 (0.351-1.873)	0.625	0.698 (0.293-1.664)	0.417	-1.441-0.568	0.432
Hypertension, yes	1.262 (0.696-2.289)	0.443	1.247 (0.652-2.387)	0.504	1.249 (0.644-2.420)	0.511	-0.486-0.993	0.504
Diabetes mellitus, yes	1.292 (0.706-2.365)	0.406	1.337 (0.705-2.536)	0.374	1.379 (0.716-2.653)	0.336	-0.358-1.116	0.375
Dyslipidemia, yes	0.600 (0.330-1.092)	0.094	0.576 (0.303-1.092)	0.091	0.571 (0.296-1.101)	0.094	-1.348-0.133	0.114
Smoking, yes	1.546 (0.844-2.832)	0.158	1.743 (0.754-4.027)	0.914	2.195 (0.908-5.304)	0.081	-0.077-1.984	0.083
Cerebral strokes, yes	2.724 (0.712-10.42)	0.143	2.698 (0.683-10.66)	0.157	2.975 (0.721-12.28)	0.145	-0.301-21.28	0.110
Serum exosome miR-501-3p, High, yes	1.954 (1.062-3.596)	0.031			2.662 (1.339-5.292)	0.005	0.270-1.845	0.008

表1: 認知症のリスクである年齢、性別や生活習慣病歴といった背景因子で調整したときの血中エクソソームmiR-501-3pと軽度認知機能障害の関係 (主な発表論文の文献-2.より引用)

今回の検討により、血中エクソソームmicroRNA値が認知症の診断マーカーとして有用である可能性を示した点は学術的に重要である。非侵襲的な検査法として認知症の早期発見や予防に役立つ可能性があり、患者の負担を軽減し、医療コストの削減にも寄与する社会的意義のある成果であると考えられました。

なお、研究経過中に認知症の最大のリスク因子として難聴が注目され始めました (Lancet. 396:413-46, 2020)。聴覚障害という点に着目して、認知症の病態メカニズムの解明に寄与する仮説の立案にも取り組みました。

主な発表論文

1. Toyama K, Igase M, Spin JM, Abe Y, Javkhlant A, Okada Y, Wagenhäuser MU, Schelzig H, Tsao PS, Mogi M. Exosome miR-501-3p Elevation Contributes to Progression of Vascular Stiffness. *Circ Rep.* 3:170-177 (2021)
2. Toyama K, Spin JM, Tsao PS, Maruyama K, Osawa H, Mogi M, Takata Y. Serum microRNA-501-3p is a potential diagnostic tool for detecting mild cognitive impairment: Ehime genome study. *J Neurochem.* 166:960-971 (2023)
3. Toyama K, Mogi M. Hypertension and the development of hearing loss. *Hypertens Res.* 45:172-174 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toyama Kensuke, Mogi Masaki	4. 巻 45
2. 論文標題 Hypertension and the development of hearing loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 172 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00789-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyama Kensuke, Igase Michiya, Spin Joshua M., Abe Yasunori, Javkhant Amarsanaa, Okada Yoko, Wagenhauser Markus U., Schelzig Hubert, Tsao Philip S., Mogi Masaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Exosome miR-501-3p Elevation Contributes to Progression of Vascular Stiffness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 170 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-20-0135	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

1. 著者名 Toyama Kensuke, Spin Joshua M., Tsao Philip S., Maruyama Koutatsu, Osawa Haruhiko, Mogi Masaki, Takata Yasunori	4. 巻 166
2. 論文標題 Serum microRNA 501 3p is a potential diagnostic tool for detecting mild cognitive impairment: Ehime genome study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 960 ~ 971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 外山研介
2. 発表標題 血液脳関門破綻や聴覚器障害から認知症対策を考える
3. 学会等名 高齢化と生体恒常性研究会・第2回交流会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外山研介、茂木正樹
2. 発表標題 シンポジウム3 「血管性認知症に関連する脳血管・血流・代謝研究の最前線」血液脳関門破綻や感覚器障害から考えた認知症対策
3. 学会等名 第11回日本脳血管・認知症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 外山研介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Clinical Neuroscience、40巻12号、pp1594-1598、中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 BBB-単なる障壁ではない（認知機能障害におけるmicroRNAの診断的意義）	

〔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
研究分担者	茂木 正樹 (Mogi Masaki) (20363236)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	
研究分担者	三宅 吉博 (Miyake Yoshihiro) (50330246)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

	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
研究協力者	高田 康徳 (Takata Yasunori) (20432792)	愛媛大学・医学系研究科 (16301)	

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			
米国	Stanford University School of Medicine			
ドイツ	Heinrich-Heine-University			