

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15690

研究課題名（和文）エクソソームmiRNAを用いた多発性硬化症の血液脳関門破綻バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of the biomarker for the blood-brain barrier breakdown in multiple sclerosis by exosomal miRNA.

研究代表者

栞田 大生（Masuda, Hiroki）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10722936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア機能と関連が報告されているmiR-34a、miR-145、miR-146aを再発期の多発性硬化症（MS）10名、健常人8名の血清を用いて測定した。MSの再発時血清では健常人に比しmiR-145のCt値が有意に低下していた。さらに、そのMS患者10名においてMS患者の臨床的重症度の相関を調べた結果、再発6か月後の重症度とmiR-145のCt値が正の相関を示す傾向にあった。すなわち、miR-145の発現が高いと6か月後の重症度が低い傾向にあることを意味し、miR-145がMS再発時に保護的に機能している可能性があることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-145は間葉系幹細胞由来の細胞から産生される。ニューロンやグリアなどがそれらの細胞に含まれるため、中枢神経由来のエクソソーム内に含まれるmiR-145の産生源はニューロンやグリアであると想定される。miR-145の主な機能としては血管平滑筋細胞の調節が挙げられ、血管内皮細胞へのダメージを軽減する役割を有すると報告されている。また、miR-145はマクロファージによる炎症を抑えることも報告されており、miR-145はMS再発時において中枢神経系に保護的に作用している可能性がある。近年の核酸医薬開発技術の発展に伴い、将来的にmiR-145による治療応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Serum mitochondria-related micro RNAs including miR-34a, miR-145, and miR-146a were measured in 10 patients with multiple sclerosis (MS) and 8 healthy controls (HCs). Serum was obtained in the acute phase in patients with MS. Delta-Ct of miR-145 was decreased in the serum of MS patients compared with HCs. It showed the tendency of the positive association with the clinical severity of MS six months after the relapse. These results suggest miR-145 may play a protective role in the acute phase of MS.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：多発性硬化症 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は脳、脊髄などの中枢神経系に脱髄病変が多発する疾患であり、再発寛解を繰り返しながら神経学的後遺症が蓄積していく原因不明の神経難病である。一方、血液脳関門 (Blood brain barrier, BBB) は脳や脊髄などの中枢神経系を異物から防ぐバリア機能を有する。MS では BBB が破綻することでリンパ球が脳実質に侵入し脱髄巣を形成する。現在、臨床的には Qalb や造影 MRI で BBB 破綻を評価することが多いが、ともに侵襲的であり、経時的なフォローを行いにくい点が問題である。そのため、BBB 破綻を容易に検出し、定量可能な新規バイオマーカーの確立が望まれる。

また、組織低酸素も MS の脱髄形成において重要であることが複数報告されている (Brain. 2016;139:807-15、Ann Neurol. 2013;74:815-25、Sci Rep. 2016;6:33249)。さらに、MS においてミトコンドリアの機能障害が軸索変性をきたし (Mult Scler. 2014;20:1806-13) 虚血による低酸素血症はミトコンドリア機能を低下させ血管内皮細胞機能を障害し、BBB 破綻をきたす (Stroke. 2015;46:1681-9.)。

一方、microRNA(miRNA)は 20-24 塩基の小分子 RNA で、転写後制御を介して標的遺伝子の発現を制御している。miRNA はエクソソームという小胞顆粒に内包され、細胞間コミュニケーションツールとして働く。エクソソームは細胞から能動的に分泌されるためその細胞の状態を反映することから、疾患状態をより反映すると考えられる。さらに、エクソソームは血液中でも安定して存在するため、エクソソーム miRNA は診断用バイオマーカーとしても期待されている。近年、中枢神経由来のエクソソームを血中で選別する方法が実用化され、中枢神経由来のエクソソーム miRNA を血液検体から測定することが可能になり、髄液検査を介さない新規バイオマーカーの確立が可能になった。

我々は予備実験で、少数の MS 患者の急性期髄液のエクソソーム miRNA を測定し、miR-34a-5p などの miRNA の上昇を確認した。一方、miR-34a をトランスフェクションした血管内皮細胞を用いた研究から、miR-34a を過剰に発現させると血管内皮細胞のミトコンドリア機能が低下し、シトクロム c を低下させることで ATP 産生を阻害、BBB の接着因子である ZO-1 を破綻させ BBB の透過性を上昇させることが報告された (J Cereb Blood Flow Metab. 2016;36:387-92.)。このことは組織低酸素が MS の BBB 破綻の病態において重要な役割を果たしているという仮説と矛盾しない。

### 2. 研究の目的

本研究では、miR-34a などのミトコンドリア機能低下を引き起こす miRNA の MS の BBB 破綻病態への関与を証明し、MS の新規バイオマーカーとして確立することを目的とする。さらに、当該 miRNA と Qalb との比較を通じて血液検査だけで BBB 破綻を定量化することを目指す。

### 3. 研究の方法

MS 患者におけるエクソソーム miRNA の検討

in vitro ヒト BBB モデルを使用した検討

モデル動物におけるエクソソーム miRNA の変化

### 4. 研究成果

中枢神経由来のエクソソーム miRNA を血液検体から抽出する技術を用いて、ミトコンドリア機能と関連が報告されている miR-34a、miR-145、miR-146a を再発期の MS 患者 10 名、健常人 8

名の血清を用いて測定した。ここで、Ct(threshold cycle)は、反応の蛍光シグナルが Threshold Line(閾値)を超えた時の PCR サイクル数を意味し、遺伝子の発現量が多いほど、有意な増幅が見られるサイクル数の値は小さくなる(Ct 値は小さくなる)。他のサンプルとの比較を可能にするため、内在性コントロールの補正を加えた Ct 値が解析に用いられる。解析の結果、MS の再発時血清では健常人に比し miR-145 の Ct 値が有意に低下していた(中央値 15.3 vs 15.9、四分位範囲 0.86 vs 1.0、 $P=0.043$ )。

さらに、その MS 患者 10 名において MS 患者の臨床的重症度を示す Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS) を用いた検討を行った結果、再発 6 か月後の EDSS と miR-145 の Ct 値が正の相関を示す傾向にあった(Spearman's  $\rho=0.59$ 、 $P=0.072$ )。すなわち、miR-145 の発現が高いと 6 か月後の重症度が低い傾向にあることを意味し、miR-145 が MS 再発時に保護的に機能している可能性があることを示唆する所見を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------