

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591087

研究課題名（和文）神経難病における microRNA の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of microRNA in the intractable neurological disease

研究代表者

河野 祐治（KAWANO YUJI）

九州大学・医学研究院・特任講師

研究者番号：20333479

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経難病における microRNA の役割の解明を目的とする。特に microRNA によって調節されると推測される疾患関連遺伝子の 3'UTR の領域に候補をしぼり、可能な範囲で患者での全配列の決定を進めた。多発性硬化症に関しては、IL7R, IL2RA など合計 14 種類。筋萎縮性側索硬化症に関しては、FUS, Alsin など合計 16 種類の遺伝子を選択した。個々の遺伝子での患者での有意な変異は見つからなかったが、その結果と他プロジェクトとのデータとを総合して発表の予定とした。

研究成果の概要（英文）：In this study, it is aimed for the elucidation of the role of microRNA in the neurologic intractable disease. The 3'UTR of disease-related genes, which is estimated to be regulated by microRNA, were proceeded to determine the entire sequence in the patient to the extent possible. For multiple sclerosis, a total of 14 genes, such as IL2RA and IL7R was selected. With respect to amyotrophic lateral sclerosis, we selected a total of 16 genes such as FUS and Alsin. The significant mutation by a patient by each gene was not found, but we assumed that I was planning to synthesize the result and data with other projects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：臨床神経分子遺伝学

キーワード：神経難病，多発性硬化症，筋萎縮性側索硬化症，microRNA，疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは蛋白質をコードする部分以外に、蛋白質をコードしない、すなわち **non-coding RNA** をコードする遺伝子が多数見つっている。その中で **micro RNA** は、長い前駆体である **pri-miRNA** から最終的に約 22 ベースにプロセッシングされた二本鎖 **RNA** であり、主に遺伝子の転写後調節に関与している。その転写後調節機構は多岐に渡るが、神経系ならびに免疫系においても、その機能調節機構としての役割が注目される。例えば遺伝性神経変性疾患の一つである **Huntington 病** においては、その原因蛋白は **Ago2** と結合し、転写後調節に関与すること、**Parkinson 病** では中脳ドーパミンニューロンに発現する **miR-133b** が患者では発現せず、そのために神経細胞の機能異常をきたす可能性が報告されている。また精神発達遅滞をきたす脆弱 **X 症候群** においても **microRNA** との関連が知られている。免疫系に関しても多くの報告があり、例えば自己免疫を抑制するとされる調節性 **T 細胞** は **Dicer** 依存性にその機能を発揮している。したがって、神経変性疾患や自己免疫性神経疾患の病態に **microRNA** が関与していることは容易に推測される。

近年のゲノム研究の進歩に伴い、神経難病の中でも遺伝性が明確な病気に関しては多数の原因遺伝子が同定されてきた。一方、大多数を占める孤発性神経難病においても、例えば **MS** ではゲノムワイド相関解析 (**GWAS**) を用いて、既知の **HLA** 領域の他に感受性遺伝子として **IL7RA** が同定され、**ALS** では同様に **ITPR2** が同定された。この **GWAS** は、**common variant** 仮説、すなわち同じ疾患の患者では同じ変異を持つという仮説の下では有効であり、その仮説の正当性を示す例であった。しかし一方、**multiple rare variants** 仮説、すなわち一つの疾患は、別々の変異を持つさまざまな患者小グループの集合体であるという仮説の下では、**GWAS** では目的とする遺伝子変異は検出困難とされる。実際に **SLE** での **TREX1** 変異のように **multiple rare variants** 仮説に従うものも報告されている。したがって現状ではどちらの仮説とも正しい場合があり、どちらかが有利ともいえない。したがって神経難病でも **common variant** 仮説と **multiple rare variants** 仮説を適切に組み合わせた検討が必要と考える。

ところで、これまでは主に蛋白質をコードした領域を中心に解析が進められてきたが、前述のように **microRNA** が各種の転写後

調節に関与している証拠があり、疾患の病態にも関与することが予測されるため、この **microRNA** に絞った解析が必要と考えた。解析に際して、今回対象とする **MS** と **ALS** ではすでに **GWAS** が行われており、一定の成果を挙げていることより、本研究では **common variant** 仮説、**multiple rare variants** 仮説を適宜採用し、個々の対象領域を詳しく調べる方法での検討を考えた。

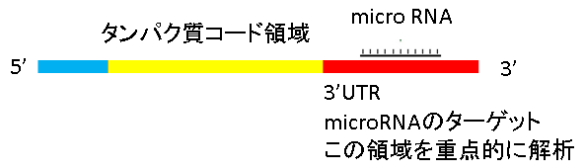
2. 研究の目的

本研究では、神経難病における **microRNA** の役割の解明を目的とする。神経難病のうちでも、神経変性疾患では病気の進行を遅らせることは現状では全く不可能である。また炎症性神経疾患も、殆どが慢性で難治性の経過をたどる。本研究で重点的な対象とする疾患は神経難病の中でも特に問題の大きな炎症性/自己免疫性神経疾患の代表である多発性硬化症 (**MS**) とその類縁疾患の視神経脊髄炎 (**NMO**)、それに神経変性疾患の代表である筋萎縮性側索硬化症 (**ALS**) を重点的な対象疾患として、**microRNA** コード領域およびその周辺の調節領域の **SNP**、各種変異、それに **mRNA** のターゲット領域を患者と対照群で比較検討する。その後、疾患関連 **microRNA** を基に、**in vitro**、**in vivo** での解析につなげる。

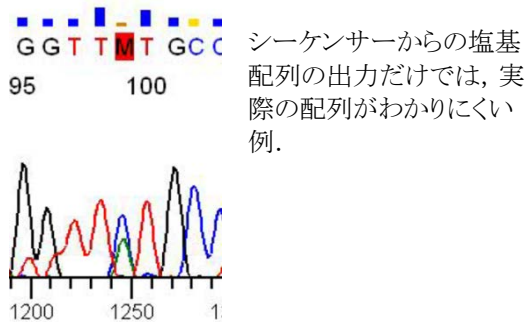
3. 研究の方法

本研究での対象疾患は筋萎縮性側索硬化症 (**ALS**) と多発性硬化症 (**MS**) としている。それらにおいて、**microRNA** のコード領域およびその周辺の調節領域の **SNP**、それに、**microRNA** によって調節される疾患感受性遺伝子の **microRNA** ターゲット領域を患者と対照群で比較検討した。特に **microRNA**、および **microRNA** によって調節されると推測される疾患関連遺伝子の 3'UTR の領域に候補をしばり、可能な範囲で患者での全配列の決定を進めた。

具体的には、これまでに報告された大規模スタディーに基づいた疾患感受性遺伝子、家族性 **ALS** の原因遺伝子、それに病態に関与すると推測された遺伝子を重点的に、**MS** に関しては、**IL7R**、**IL2RA**、**CD58** など、合計 14 種類の遺伝子、**ALS** に関しては、**IFNK**、**C9orf72**、**UNC13A**、**TDP-43**、**FUS**、**ANG**、**Alsin**、など合計 16 種類の遺伝子を選択した、それら遺伝子の 3'UTR の領域の、特に既知の **microRNA** の標的となり得る領域を重点的に、**PCR** で **DNA** を分離増幅し、それをダイレクトシーケンシング法にて **ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer** を用いて可能なかぎり 3'UTR の全配列の決定を進めた。



この時に、ヘテロで変異があるものは、それがシーケンサーからの塩基配列の出力を見ただけではわかりにくいので、シーケンサーの元データを手動で参照し、さらに逆方向からの配列も参考にして、変異を確認した。その作業が大部分を占めた。



4. 研究成果

一部の増幅困難領域を除くほぼすべての領域について増幅と配列決定のためのプライマー設計が完了し、患者での遺伝子配列決定がほぼ完了した。残念ながら遺伝子個々において患者での有意な変異は見つかっていないが、それぞれの遺伝子変異の組み合わせと他プロジェクトのデータ(これまでに行なってきたサイトカインのデータ、並行して行なっていた他の疾患関連遺伝子との複合解析など)を総合して発表の予定としている。

```

YK0305-1D      TTCTAAGACAGTTGGGGAGCTCCAGGAGCTGTTTTAAAGTTGGGGAGAGACTGGATTCCAG
YK031B-34      TTCTAAGACAGTTGGGGAGCTCCAGGAGCTGTTTTAAAGTTGGGGAGAGACTGGATTCCAG
YK031B-36      TTCTAAGACAGTTGGGGAGCTCCAGGAGCTGTTTTAAAGTTGGGGAGAGACTGGATTCCAG
YK031B-38      TTCTAAGACAGTTGGGGAGCTCCAGGAGCTGTTTTAAAGTTGGGGAGAGACTGGATTCCAG
YK031B-40      TTCTAAGACAGTTGGGGAGCTCCAGGAGCTGTTTTAAAGTTGGGGAGAGACTGGATTCCAG
*****
YK0305-1D      CCTGCAAAAGCTGTTTTGGAAGACTAAAACCACTGAGGAGAGGTGGAGGTGCTTTGGGG
YK031B-34      CCTGCAAAAGCTGTTTTGGAAGACTAAAACCACTGAGGAGAGGTGGAGGTGCTTTGGGG
YK031B-36      CCTGCAAAAGCTGTTTTGGAAGACTAAAACCACTGAGGAGAGGTGGAGGTGCTTTGGGG
YK031B-38      CCTGCAAAAGCTGTTTTGGAAGACTAAAACCACTGAGGAGAGGTGGAGGTGCTTTGGGG
YK031B-40      CCTGCAAAAGCTGTTTTGGAAGACTAAAACCACTGAGGAGAGGTGGAGGTGCTTTGGGG
*****
YK0305-1D      ACACCTGAAATGGATTCTTGGAAAGATTCTGAAGGCTGTGTTGAAAAGACACTATAGCTG
YK031B-34      ACACCTGAAATGGATTCTTGGAAAGATTCTGAAGGCTGTGTTGAAAAGACACTATAGCTG
YK031B-36      ACACCTGAAATGGATTCTTGGAAAGATTCTGAAGGCTGTGTTGAAAAGACACTATAGCTG
YK031B-38      ACACCTGAAATGGATTCTTGGAAAGATTCTGAAGGCTGTGTTGAAAAGACACTATAGCTG
YK031B-40      ACACCTGAAATGGATTCTTGGAAAGATTCTGAAGGCTGTGTTGAAAAGACACTATAGCTG
*****

```

ある遺伝子での 3' UTR の配列。最上段が参照配列。それ以外の 2-4 段が患者での配列。この例では患者配列は参照配列に一致していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件) (全て査読あり)

1) Interleukin-7 receptor alpha gene polymorphism influences multiple sclerosis risk in Asians. Fang L, Isobe N, Yoshimura S, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Doi H, Ochi K, Miyamoto K, Kawano Y, Kira J; South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. *Neurology*. 2011 Jun 14;76(24):2125-7

2) [Case of *Borrelia* brainstem encephalitis presenting with severe dysphagia]. Kawano Y, Shigeto H, Shiraishi Y, Ohyagi Y, Kira. *Rinsho Shinkeigaku*. 2010 Apr;50(4):265-7. Japanese.

3) Influence of HLA-DRB1 alleles on the susceptibility and resistance to multiple sclerosis in Japanese patients with respect to anti-aquaporin 4 antibody status. Isobe N, Matsushita T, Yamasaki R, Ramagopalan SV, Kawano Y, Nishimura Y, Ebers GC, Kira J. *Mult Scler*. 2010 Feb;16(2):147-55.

4) Neural damage associated with atopic diathesis: a nationwide survey in Japan. Isobe N, Kira J, Kawamura N, Ishizu T, Arimura K, Kawano Y. *Neurology*. 2009 Sep 8;73(10):790-7.

5) Extensive vasogenic edema of anti-aquaporin-4 antibody-related brain lesions. Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Ishizu T, Kawano Y, Yoshiura T, Ohyagi Y, Kira J. *Mult Scler*. 2009 Sep;15(9):1113-7.

6) Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative opticospinal multiple sclerosis in Japanese. Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Shi N, Kawano Y, Wu XM, Yoshiura T, Nakao Y, Ishizu T, Kira JI. *Mult Scler*. 2009 Jul;15(7):834-47.

7) Multimodality-evoked potential study of anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative multiple sclerosis patients.

Watanabe A, Matsushita T, Doi H, Matsuoka T, Shigeto H, Isobe N, Kawano Y, Tobimatsu S, Kira J. J Neurol Sci. 2009 Jun 15;281(1-2):34-40.

8) Association of the HLA-DPB1*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with idiopathic central nervous system demyelinating disorders. Matsushita T, Matsuoka T, Isobe N, Kawano Y, Minohara M, Shi N, Nishimura Y, Ochi H, Kira J. Tissue Antigens. 2009 Feb;73(2):171-6.

〔学会発表〕（計 3 件）

1) 河野ら, 自己抗体プロファイルからみた多発性硬化症の解析, 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 18 日 名古屋国際会議場

2) 河野ら, 免疫性神経疾患の高感度自己抗体プロファイル, 第 51 回日本神経学会学術大会 2010 年 5 月 22 日 東京国際フォーラム

3) 河野ら, FACS の高感度化による抗 AQP4 抗体サブクラス解析の意義, 第 50 回日本神経学会学術大会 2009 年 5 月 22 日 仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 祐治 (KAWANO YUJI)
九州大学 医学 (系) 研究科 (研究院)
特認講師
研究者番号 : 20333479

(2) 研究分担者

三木 哲郎 (MIKI TETSUROU)
愛媛大学 プロテオ医学研究センター
教授
研究者番号 : 00174003

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :