

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659423

研究課題名(和文) 新たな神経変性疾患のバイオマーカーとしてのmiRNA

研究課題名(英文) micro RNA as a novel biomarker for neurodegenerative diseases

研究代表者

武田 篤 (TAKEDA, Atsushi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：70261534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)の髄液中エクソソームに含有されるmiRNAの解析を行った。対照3例およびPD5例の新鮮髄液10mlをAgilent社のmiRBase ver19.0で網羅的解析したところ、対照に対し有意に発現増加・減少がみられたmiRNAを複数得た。次いで、これらのmiRNAがターゲットとする遺伝子を解析したところ、miR-1xxxがTargetScan, miRDB, DIANA LABの3種の解析アルゴリズムで同一の遺伝子を標的とすることが判明した。この遺伝子はシヌクレインの翻訳後修飾において極めて重要な役割を果たす事が知られており、PDの分子病態との関連が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed miRNAs in exosome fractions of human cerebrospinal fluid (CSF). The CSF was collected from five cases with Parkinson disease (PD) and three control cases. The samples were analyzed by using the miRBase ver19.0 (Agilent) and several miRNAs were identified to be significantly increased or decreased. By using the three algorithms, TargetScan, miRDB and DIANA LAB, gene X was revealed to be a target gene of the miR-1xxx. The protein product of gene X is known to play a key role in the post-translational modification of alpha-synuclein, suggesting the changes of miRNA levels in CSF are reflecting pathological processes in PD brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：パーキンソン病 バイオマーカー シヌクレイン/パチー

### 1. 研究開始当初の背景

応募当時知られていたヒトの miRNA は 1,424 種 (2011 年 10 月 14 日) であったが、うち 1,223 種が解析可能となっており、疾患関連 miRNA スクリーニングを行うための好条件が揃いつつあった。パーキンソン病 (PD) での miRNA 先行研究としては、FGF20 (fibroblast growth factor 20) の miR-433 結合部位の点変異が S 発現量を増加させること (Am J Hum Genet 2008)、PD 剖検中脳で miR-133b が低下していること (Science 2008) が報告されていた。miRNA は転写調整も行うとされるが、転写後調整が主であることが知られている。一般的に転写後調整では miRNA は siRNA に類似した挙動を示すため、miRNA の低下は対応するタンパク発現量の増加に繋がる可能性が高く、こうして増加したタンパクが細胞毒性を發揮する可能性がある。一方、疾患関連 miRNA が増加することにより、特定のタンパク発現量が減少し神経変性をもたらす可能性もある。この結果例えば シヌクレインの転写抑制因子が減少したり、他の神経保護的に作用するタンパク発現が低下したりする可能性もある。miRNA 研究が進んでいる癌・免疫分野ではこの様な現象が実際に確認されており、例えば miR-21 は多くの癌で発現の亢進が確認されている。

### 2. 研究の目的

PD と多系統萎縮症 (MSA) は細胞内における異常凝集化した シヌクレイン沈着を共通の病理学的特徴とする神経変性疾患である。近年これら疾患の病態進展に関して、シヌクレイン病理が細胞から細胞へ伝達される現象が相次いで報告され注目されている。応募者は細胞外分泌顆粒 (エクソソーム) を介した miRNA による細胞間情報伝達が、S 病理進展に重要な役割を果たすのではないかという仮説を立てた。即ち、外来 miRNA が細胞に取り込まれた後ターゲットとなる遺伝子発現に影響を与え、細胞内環境を変化させることで、S 病理が誘導され変性が進展する可能性を考えている。髄液・血清 miRNA の網羅的解析が病態解明の一端に結びつき、また miRNA が新たなバイオマーカーとなる事を予想して本研究を着想した。具体的には PD、MSA の髄液由来の miRNA を健常人と比較解析することにより、病的環境下で細胞間を伝播する miRNA 情報を知る事ができる。これらの疾患に共通して発現変化を生じる miRNA を同定し新たなバイオマーカーとしての応用可能性を検討するとともに、そのターゲット遺伝子の発現変化が、シヌクレインパチーの分子病態に関係している可能性を考えて、in vitro での病態解明を進める。

### 3. 研究の方法

PD、MSA、および年齢を合わせた健常人の

髄液からキットを用いてエクソソーム分画を単離し、その中に含まれている miRNA を抽出・精製した。得られた miRNA をマイクロアレイに供して網羅的に解析し、疾患特異的に発現変化のある miRNA を同定し、続いて miRNA マイクロアレイ解析で絞り込まれた候補 miRNA に対して個別にプローブを作製し、RT-PCR 法でよりより多数例において発現変化が認められる事を確認すると共に、病期の異なる症例間でも発現量を比較し早期診断のバイオマーカーとしての有用性を検討した。以上のプロセスを経て確認同定された疾患関連 miRNA の生理的機能について、培養細胞モデルを用いた検討を行い、シヌクレイン凝集沈着から細胞変性に至る病的代謝過程への関与を解析した。

### 4. 研究成果

パーキンソン病 (PD) の髄液中エクソソームに含有される miRNA の解析を行った。対照 3 例および PD5 例の新鮮髄液 10ml を Agilent 社の miRBase ver19.0 で網羅的解析したところ、対照に対し有意に発現増加・減少がみられた miRNA を複数得た。次いで、これらの miRNA がターゲットとする遺伝子を解析したところ、miR-1xxx が TargetScan, miRDB, DIANA LAB の 3 種の解析アルゴリズムで同一の遺伝子を標的とすることが判明した。この遺伝子は シヌクレインの翻訳後修飾において極めて重要な役割を果たす事が知られており、PD の分子病態との関連が考えられた。さらに、miR-1xxx の細胞内における機能を解析するために、本 miRNA の発現コンストラクトおよび、内在する miR-1xxx を効率よくノックダウンするコンストラクトを作製し、SH-SY5Y への導入を行った。現在のところ、期待される シヌクレインの翻訳後修飾に対する変化は検出できていないが、観察時間、導入効率等の条件を設定し検討を継続している。

### 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 9 件)

- 1) Stankovic I., Krismer F., Jesic A., Antonini A., Benke T., Brown RG., Burn DJ., Holton JL., Kaufmann H., Kostic VS., Ling H., Meissner WG., Poewe W., Semnic M., Seppi K., Takeda A., Weintraub D., Wenning GK., Cognitive impairment in multiple system atrophy: A position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS multiple system atrophy (MODMSA) Study Group., Movement Disorders (in press), 2014. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753321>

- 2) Takeda A., Baba T., Kikuchi A., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E., Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* (in press), 2014. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625830>
- 3) Hasegawa T., Kikuchi A., Takeda A., Pathogenesis of multiple system atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience* 1:189-194, 2013. 査読有  
DOI: 10.1111/ncn3.57
- 4) Kikuchi A., Baba T., Hasegawa T., Kobayashi M., Sugeno N., Konno M., Miura E., Hosokai Y., Ishioka T., Nishio Y., Hirayama K., Suzuki K., Aoki M., Takahashi S., Fukuda H., Itoyama Y., Mori E., Takeda A., Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year longitudinal cohort study, *BMJ Open* 3:e002249, 2013. 査読有  
DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002249
- 5) Kaneko K., Tano O., Kikuchi A., Hasegawa T., Tateyama M., Yoshioka M., Saito H., Watanabe O., Takeda A., Aoki M., Anti-voltage-gated potassium channel antibody is associated with chronic autonomic and sensory neuropathy, *J. Neurol.* 260:315-317, 2013. 査読有  
DOI: 10.1007/s00415-012-6730-0
- 6) Konno M., Hasegawa T., Baba T., Miura E., Sugeno N., Kikuchi A., Fiesel FC., Sasaki T., Aoki M., Itoyama Y., Takeda A., Suppression of dynamin GTPase decreases  $\alpha$ -Synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy, *Molecular Neurodegeneration* 7:38, 2012. 査読有  
DOI: 10.1186/1750-1326-7-38
- 7) Hiraoka K., Okamura N., Funaki Y., Hayashi A., Tashiro M., Hisanaga K., Fujii T., Takeda A., Yanai K., Iwata R., Mori E., Cholinergic deficit and response to donepezil therapy in Parkinson's disease with dementia, *Eur Neurol* 68:137-143, 2012. 査読有  
DOI: 10.1159/000338774
- 8) Sawada Y., Nishio Y., Suzuki K., Hirayama K., Takeda A., Hosokai Y., Ishioka T., Itoyama Y., Takahashi S., Fukuda H., Mori E., Attentional set-shifting deficit in Parkinson's disease is associated with prefrontal dysfunction: An FDG-PET study. *PLoS ONE* 7: e38498, 2012. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0038498
- 9) Baba T., Kikuchi A., Hirayama K., Nishio Y., Hosokai Y., Kanno S., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Suzuki K., Takahashi S., Fukuda H., Aoki M., Itoyama Y., Mori E., Takeda A., Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study, *Brain* 135:161-169, 2012. 査読有  
DOI: 10.1093/brain/awr321
- [学会発表](計 14件)
- 1) Takeda A., Hyposmia and cholinergic deficiency in Parkinson Disease, The13th International Parkinson Disease Symposium in Takamatsu, Takamatsu, Japan, 2014年02月21-22日
- 2) Kikuchi A., Takeda A., In vivo visualization of  $\alpha$ -synuclein depositions in the human brain with multiple system atrophy and Parkinson's disease, 1st Annual MJFF Alpha-Synuclein Imaging Summit, New York, USA, 2013年11月08日
- 3) Satake W., Ando Y., Tomiyama H., Takeda A., Hasegawa K., Yamamoto M., Murata M., Hattori N., Toda T., Search for rare-variant risks of Parkinson's disease by sequencing of candidate genes and exome sequencing, 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, Australia, 2013年06月16-20日
- 4) Hasegawa T., Konno M., Miura E., Sugeno N., Nagai Y., Fujikake N., Suzuki M., Kikuchi A., Aoki M., Takeda A., RNAi-mediated silencing of VPS35 exacerbates phenotypic and locomotor abnormalities in  $\alpha$ -synuclein transgenic drosophila, 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, Australia, 2013年06月16-20日
- 5) Miura E., Hasegawa T., Konno M., Sugeno N., Kikuchi A., Baba T., Aoki M., Takeda A., RNAi-mediated knockdown of VPS35 impairs  $\alpha$ -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D, 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, Australia, 2013年06月16-20日
- 6) Sugeno N., Hasegawa T., Konno M.,

- Miura E., Kikuchi A., Aoki M., Takeda A., Nedd4 E3 ubiquitin ligase facilitates the endosomal targeting of alpha-synuclein, 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, Australia, 2013 年 06 月 16-20 日
- 7) Kikuchi A., Baba T., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Aoki M., Takeda A., Differentiating Parkinson's disease from multiple system atrophy by [123I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy and olfactory test, 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Sydney, Australia, 2013 年 06 月 16-20 日
- 8) Takeda A., Severe hyposmia is a prodromal symptom of dementia in Parkinson disease, 9th International congress on mental dysfunction & other non-motor features in Parkinson's disease and related disorders, Seoul, South Korea, 2013 年 04 月 18-21 日
- 9) Satake W., Yamamoto K., Ando Y., Takeda A., Tomiyama H., Kawakami H., Hasegawa K., Obata F., Watanabe M., Tamaoka A., Nakashima K., Sakoda S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Nakamura Y., Toda T., Japanese 2nd GWAS identifies strong association at a novel risk locus and MCCC1 for Parkinson's disease, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 10) Hasegawa T., Konno M., Baba T., Sugeno N., Kikuchi A., Miura E., Takeda A., The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of -synuclein, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 11) Baba T., Kikuchi A., Hirayama K., Nishio Y., Hosokai Y., Kanno S., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E., Takeda A., Severe olfactory dysfunction is predictive of dementia associated with Parkinson's disease: A 3-year longitudinal study, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 12) Konno M., Hasegawa T., Baba T., Miura E., Sugeno N., Kikuchi A., Aoki M., Takeda A., Dynamin GTPase activity decreases alpha-synuclein uptake in neuronal and oligodendroglial cells, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 13) Sugeno N., Hasegawa T., Konno M., Miura E., Baba T., Kikuchi A., Aoki M., Takeda A., The E3 ligase Nedd4 participates in the internalization process of alpha-synuclein, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 14) Shoji Y., Nishio Y., Takeda A., Uchiyama M., Kashinoura T., Hosokai Y., Fukuda H., Mori E., Neural basis of memory impairment in Parkinson's disease: A longitudinal PET study, 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland, 2012 年 06 月 17-22 日
- 〔図書〕(計 4 件)
- 1) 武田篤、パーキンソン病、「ガイドライン外来診療 2013(泉孝英編)」, p527-529、日経メディカル開発、2013.
- 2) 馬場 徹、武田篤、(第 5 章)パーキンソン病とその他の症状や疾患 その考え方と対応 パーキンソン病と嗅覚障害の関係は? 【あなたも名医!ここを押さえる! パーキンソン病診療 34 のギモンに答える】 jmed mook23 号 p150-152、日本医事新報社 2012.
- 3) 武田篤、パーキンソン病の病因・病態生理、「GP・レジデントのためのパーキンソン病テキストブック(山本光利編)」, p30-39、アルタ出版 2012.
- 4) 武田篤、菊池昭夫、痙性斜頸の PET、「ジストニア 2012(長谷川一子編)」, p231-233、中外医学社 2012.
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)
- 名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:
- 取得状況(計 0 件)
- 名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 篤 (TAKEDA, Atsushi)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講  
師

研究者番号：70261534

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：