

氏名	保坂 孝史		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9195号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	筋萎縮性側索硬化症（ALS）のバイオマーカーの探索研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	山崎 正志
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	増田 知之
副査	筑波大学講師	博士（医学）	井出 政行

論文の内容の要旨

保坂孝史氏の博士学位論文は、筋萎縮性側索硬化症における診断バイオマーカーを探索したものである。筋萎縮性側索硬化症のモデル動物において、細胞外の mRNA や circRNA における ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量を反映していることを明らかにし、ADAR2 が筋萎縮性側索硬化症における診断バイオマーカーの有力な候補であることを示した。その要旨は以下のとおりである。

目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、進行性の上位および下位運動ニューロンの変性による、致死性の神経変性疾患であり、現在まで生前診断が可能なバイオマーカーはない。孤発性 ALS で生じる運動ニューロン死には、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現量低下を発端とするメカニズムが関与していることが判っている。exosome などとともに細胞外に存在する RNA は、近年、有力なバイオマーカー候補とされており、ヒト体液中に存在する細胞外 RNA から、ADAR2 発現量の低下に伴う RNA 編集活性の低下を見出せれば、孤発性 ALS の診断バイオマーカーとなり得る。そこで、著者は、ADAR2 依存性編集部位を含む RNA が細胞外に存在するか、そして存在するとすれば、細胞内での ADAR2 発現量の変化によりその編集率が変化するかを調べ、孤発性 ALS の疾患バイオマーカー候補となり得るかを検討したものである。

対象と方法

著者は最初に、野生型および ADAR2 コンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) の脊髄運動ニューロンから抽出した RNA を基に、ADAR2 依存性の RNA 編集候補部位を選び出した。次に、これらの候補部位のヒトにおける相同部位が、ヒト組織由来の培養細胞で、ADAR2 依存的に RNA 編集さ

れるか検討した。さらに、同定した ADAR2 依存性編集部位を持つヒト RNA が、SH-SY5Y 細胞の培養上清中に存在するのか、存在するとすれば ADAR2 依存的にその編集率が変化するのかを調べた。

結果

著者は、野生型および AR2 マウスの脊髄運動ニューロンに発現している RNA の配列を解析し、215 箇所のア-to-I RNA 編集部位を同定した。そのうち、ヒトで相同部位を持つ 28 か所の編集部位をさらに検討し、ADAR2 依存性のヒト RNA 編集部位を 10 箇所同定した。次に、SH-SY5Y 細胞の培養上清中に、上記 10 箇所の ADAR2 依存性編集部位を持つ細胞外 RNA が存在するか調べたところ、全てが細胞外に存在していた。そして、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率は、細胞内の ADAR2 発現量に依存して変化した。さらに、環状構造を持ち、mRNA よりも安定である circular RNA (circRNA) について、細胞内外の ADAR2 依存性編集部位の編集率の変化を検討した。その結果、circGRIA2 (*hsa_circ_0125620*) が SH-SY5Y 細胞に発現しており、その glutamine/arginine (Q/R) 部位の編集率は、ADAR2 依存的に変化した。また、細胞外 *hsa_circ_0125620* は、ほぼ全ての Q/R 部位が編集型だったが、細胞内の ADAR2 発現量を低下させると、未編集型が出現した。

考察

著者は本研究で、10 箇所の ADAR2 依存性編集部位を同定した。そのうち、SON mRNA の arginine/glycine (R/G) 部位は、本研究で初めて ADAR2 依存性編集部位であることを明らかにした。さらに、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率は、細胞内の ADAR2 発現量に依存しており、この編集率の変化を、ヒト体液中で見いだせれば、孤発性 ALS の疾患バイオマーカーの開発に繋がる。特に、*hsa_circ_0125620* の Q/R 部位は、GluA2 mRNA の Q/R 部位よりも細胞内外で編集率が高く、細胞外ではほぼ全てが編集型であったが、ADAR2 ノックダウン後に未編集型が出現した。すなわち、ヒト体液中で、未編集型の細胞外 *hsa_circ_0125620* を検出できれば、細胞内の ADAR2 発現量の低下を敏感に検出できる、極めて有用なバイオマーカーとなる。

結論

著者は、細胞外の mRNA や circRNA における ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量を反映していることを同定した。RNA 編集は、中枢神経系で最も多く起こり、それゆえ脳脊髄液などに存在する RNA の編集率変化に注目することで、運動ニューロンでの ADAR2 発現量の低下を推測できる可能性が高い。近年、孤発性 ALS の ADAR2 仮説に基づいた治療法が臨床試験の段階に進展しており、著者が本研究で同定した細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率変化を患者体液中で検出できれば、孤発性 ALS の診断バイオマーカーのみならず、治療モニタリングのバイオマーカーの開発にも繋がり、ALS 診療の発展に大きく寄与するものである。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、筋萎縮性側索硬化症のモデル動物において、細胞外の mRNA や circRNA における ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量を反映していることを明らかにした。本研究の成果は、筋萎縮性側索硬化症患者の診断バイオマーカーのみならず、治療モニタリングのバイオマーカーを開発する上で重要な知見として高く評価される。

平成 30 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。