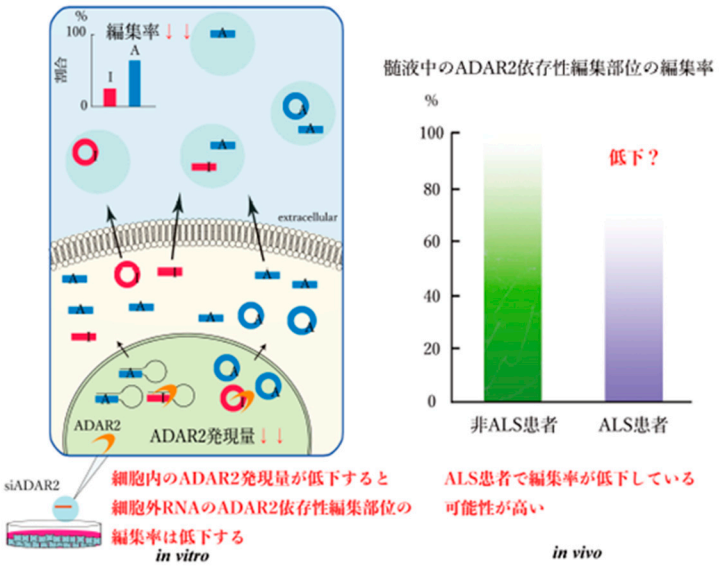
189　細胞外RNAを用いた孤発性ALSの診断バイオマーカー開発	保坂　孝史

【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）は致死性の神経変性疾患であり、現時点で根本的な治療法はなく、その開発には、診断および治療モニタリングを可能にするバイオマーカーの存在が必須である。我々は、孤発性 ALS の下位運動ニューロンで、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2（ADAR2）の発現量が低下し、GluA2 のグルタミン／アルギニン（Q/R）部位の RNA 編集異常が起こり、通常は発現しない Q/R 部位未編集型の GluA2 が発現していることを同定し、この RNA 編集異常によるグルタミン酸興奮毒性が、孤発性 ALS で認める運動ニューロン死の一次的な原因となることを証明した。また、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量と相関することを発見し、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率変化が、孤発性 ALS の疾患特異的バイオマーカーとなる可能性を示した。そこで本研究では、中枢神経由来の細胞外 RNA が存在している髄液中で ADAR2 依存性編集部位の編集率を測定し、運動ニューロンでの ADAR2 の発現量低下を同定し、孤発性 ALS の診断および治療モニタリングのバイオマーカーになり得るか検討した。

【方法】髄液 1 ml より髄液中に存在する細胞外 RNA を抽出し、細胞外 RNA の総量を測定し ALS 群と非 ALS 群で比較した。そして、その細胞外 RNA を鋳型として ADAR2 依存性編集部位を含む mRNA を増幅させた。編集率を孤発性 ALS 群および対照群で統計学的比較を行い、診断バイオマーカーとなり得るか検討した。引き続き、編集率と ALS 機能評価スケール（ALS Functional Rating Scale-Revised : ALSFRS-R）や呼吸機能検査（%VC）との相関を調べた。

【結果】髄液中に存在する細胞外 RNA の総量は微量であり、ALS 群（N＝10）と非 ALS 群（N＝13）で有意な差はなかった（ALS 群：504～1,368 pg/ml、非 ALS 群：444～1,584 pg/ml、Mann-Whitney *U*-test、*P* ＝0.208）。ALS 群で髄液中に存在する細胞外 RNA の総量と ALSFRS-R との間に有意な相関はなかった（Spearman の順位相関係数, R^2＝0.0053、*P*＝0.524）。ADAR2 依存性編集部位のうち、髄液中で ADAR2 依存性編集部位 site A を含む mRNA を検出し、その編集率は ALS 群で有意に低下していた（ALS 群（N＝9）：82.4～100%、非 ALS 群（N＝9）：95.0～100%、Mann–Whitney *U*-test、*P*＝0.024）。そして、その編集率は ALSFRS-R および%VC との間には、有意な相関は認めないものの、編集率が低下すると ALSFRS-R および%VC は低下する傾向にあった。以上の結果から、髄液中に存在する site A の編集率は、運動ニューロン内の ADAR2 発現量を反映する可能性が高く、運動ニューロンで ADAR2 発現量が低下している孤発性 ALS の疾患特異的な診断バイオマーカーおよび疾患の進行モニタリングマーカーとなる可能性が示唆された。

細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の孤発性 ALS における疾患特異的バイオマーカーの可能性



189. 細胞外 RNA を用いた孤発性 ALS の診断バイオマーカー開発

保坂　孝史

筑波大学 医学医療系 茨城県西部地域臨床教育センター

Key words：筋萎縮性側索硬化症，バイオマーカー，RNA 編集,
adenosine deaminase acting on RNA 2（ADAR2）

緒　言

1. 孤発性筋萎縮性側索硬化症と RNA 編集異常

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンが選択的に変性し細胞死を起こす、致死性の神経変性疾患である。現時点で根本的な治療法はなく、その開発には、診断および治療モニタリングを可能にするバイオマーカーの存在が必須である。近年、50 以上の ALS 関連遺伝子が発見され、それらは転写やスプライシングといった RNA メタボリズムに関連した分子をコードするため、RNA レベルでの変化が ALS の主要な病因と思われる［1］。

ALS の病態メカニズムの一つとしてグルタミン酸による興奮毒性が考えられている。グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体は、過剰な Ca^{2+}の流入により引き起こされる緩徐な神経細胞死に関与しており、この AMPA 受容体の Ca^{2+}透過性は、AMPA 受容体のサブユニットの一つである GluA2 のグルタミン／アルギニン（Q/R）部位 CAG 配列のアデノシン（A）がイノシン（I）へ置換されること（A-to-I RNA 編集）によって決定づけられる。この RNA 編集活性が落ちると、未編集型 GluA2 を含む過剰な Ca^{2+}透過性を持つ AMPA 受容体が発現する。我々はこれまでの研究で、孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて、Q/R 部位未編集型 GluA2 の発現とその RNA 編集を触媒する ADAR2 の発現量低下を発見した［2］。これらの変化は、球脊髄性筋萎縮症患者や非 ALS 患者の運動ニューロンでは認められず、孤発性 ALS に特異的な分子異常であり［3］、運動ニューロン選択的に ADAR2 活性を欠損させた変異マウス（$ADAR2^{flox/flox}$/VAChT.Cre：AR2 マウス）の解析から、運動ニューロン死の一次的な原因となることが判った［4］。また、孤発性 ALS の病理学的診断指標である transactive response DNA/RNA binding protein of 43 kDa（TDP-43）の細胞内局在異常は、患者脊髄の ADAR2 の発現量が低下した下位運動ニューロンでのみ認めた［5］。以上より、ADAR2 の発現量低下による GluA2 Q/R 部位の RNA 編集異常を発端とする異常は、孤発性 ALS に特異的な分子異常であり、孤発性 ALS の運動ニューロン死に関与している（図 1）［6］。

2. RNA 編集異常を標的とした ALS 治療法の開発とバイオマーカーの可能性

孤発性 ALS に特異的である ADAR2 の発現量低下を発端とする分子異常は、孤発性 ALS の治療標的となり得ることが判っている。先述した AR2 マウスにペランパネルや RNA アプタマーといった AMPA 受容体拮抗薬を投与すると、Ca^{2+}透過性 AMPA 受容体からの過剰な Ca^{2+}流入が抑制され、運動機能障害や脊髄前角細胞死の抑制を認めた［7，8］。また、AAV9 ベクターを用いて ADAR2 cDNA を投与し ADAR2 発現量を回復させたところ、運動ニューロン死の抑制や ALS 様症状の進行停止効果を認めた［9］。ADAR2 発現量低下を発端とする分子異常は、孤発性 ALS で病因的意義を有し、根本的な治療標的であることから、RNA 編集異常を体液中で検出できれば、診断・治療効果判定に役立つ有力なツールとなり得る。近年、細胞外に存在しながらも細胞内の環境を反映する細胞外 RNA は、神経変性疾患のバイオマーカー候補である［1］。我々は、*in vitro* で細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量と相関することを発見した［10］。ALS は運動ニューロンが特異的に変性する疾患であり、中枢神経での RNA 編集率の変化を同定することが重要である。つまり、中枢神経由来の RNA を含んでいる髄液中の細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率変化は、孤発性 ALS の疾患特異的バイオマーカーになり得る。そこで本研究の目的は、髄液中に存在する細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率を測定することで、運動ニューロンで

の ADAR2 の活性レベルを想定し、孤発性 ALS の診断および治療モニタリングのバイオマーカーを開発することである。

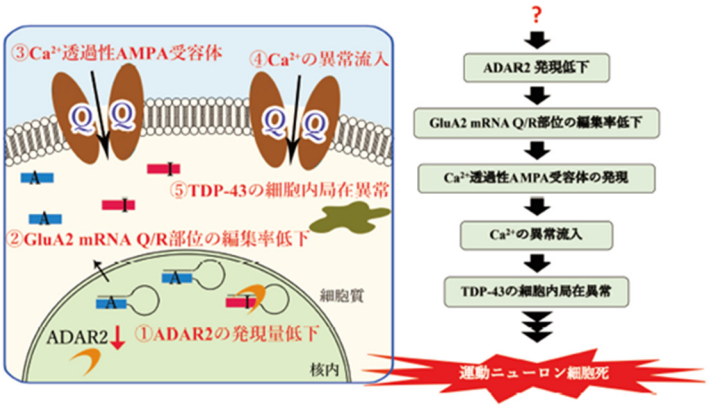


図 1. 孤発性 ALS の ADAR2 仮説

孤発性 ALS 患者の脊髄運動ニューロンでは、ADAR2 の発現量低下を発端とする特異的な分子異常を認める。孤発性 ALS の運動ニューロン死のカスケードは、①ADAR2 の発現量低下、②GluA2 mRNA の Q/R 部位の編集率低下、③Ca^{2+}透過性 AMPA 受容体の出現、④細胞内への異常な Ca^{2+}流入、⑤TDP-43 の局在異常、⑥細胞死である。

方　法

1. 患者髄液の採取

患者髄液を採取するにあたり、筑波大学附属病院、茨城県西部メディカルセンター、東京医科大学の倫理委員会にて承認を受けた。入院及び外来で診療の為に採取した、髄液検体の残検体を使用した。採取した検体は、室温、3,000 g で 15 分間遠心したのち上清を採取し、RNA 抽出時までは−80℃で保存した。

2. 髄液中の細胞外 RNA の抽出と細胞外 RNA 量の測定

髄液 1 ml より Trizol LS Reagent（Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を用いて total RNA を抽出し、RNase-free DNase Set（QIAGEN、Venlo、Netherlands）を用いて DNaseI 処理を行い、RNeasy MinElute Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて RNA 精製を行った。引き続き、RNA pico kit（Agilent Technology, Santa Clara、CA、USA）を使用し Bioanalyzer 2100 を用いて RNA 量を測定し、孤発性 ALS 患者および対照群で統計学的比較を行った。

3. 髄液中の ADAR2 依存性編集部位 site A の編集率の測定

上記で採取した total RNA を鋳型として、ADAR2 依存性編集部位 site A を含む mRNA に特異的なプライマーを用いて、One step RT-PCR Kit（QIAGEN）を使用し、RT- first PCR を行った。その後、KOD-plus-ver.2（TOYOBO、Osaka、Japan）を使用し、nested PCR、third PCR を行い、site A を含む mRNA を増幅させた。増幅した PCR 産物は、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて DNA 精製した。制限酵素による切断部位が RNA 編集の有無で異なることを利用し、DNA 1000 kit（Agilent Technology）を使用し Bioanalyzer 2100 を用いて、出現する目的の位置の DNA 量の比率から編集率を測定し、孤発性 ALS 患者および対照群で統計学的比較を行った。

4. ALS の臨床パラメーターとの相関

ALS 機能評価スケール（ALS Functional Rating Scale-Revised : ALSFRS-R）や呼吸機能検査（%VC）などの臨床パラメーターとの相関を統計学的に検討した。

5. 統計解析

統計学的には、孤発性 ALS 患者と対照群の編集率や total RNA 量の比較は Mann-Whitney *U*-test で検討し、編集率や total RNA 量と臨床パラメーターとの相関は Spearman の順位相関係数で検討した。$P<0.05$ を統計学的有意差ありとして判定した。統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics version 26（IBM、Armonk、NY、USA）を用いた。

結果および考察

1. 髄液中の細胞外 RNA 量の比較

細胞外 RNA は神経変性疾患のバイオマーカー候補であり、ALS 患者の体液中で発現量が変化する細胞外 RNA も報告されている［1］。そこで、髄液中に存在する細胞外 RNA の総量を ALS 群と非 ALS 群で比較した（図 2A）。ALS 群と非 ALS 群で、年齢に有意差はなかった（ALS 群：63.7±4.6 歳、非 ALS 群：62.1±4.1 歳、Mann-Whitney *U*-test, *P*=0.738、平均±標準誤差で表記）（data not shown）。髄液中に存在する細胞外 RNA の総量は微量であり（444～1,584 pg/ml）、ALS 群（N=10）と非 ALS 群（N=13）で有意な差は認めなかった（ALS 群：504～1,368 pg/ml、非 ALS 群：444～1,584 pg/ml、Mann-Whitney *U*-test、*P*=0.208）。次に、ALS 群で髄液中に存在する細胞外 RNA の総量と ALSFRS-R の相関を調べた（図 2B）。ALSFR-S が低下すると細胞外 RNA の総量は増加傾向にあったが、有意な相関は認めなかった（Spearman の順位相関係数、R^2=0.0053、*P*=0.524）。運動ニューロンが特異的に変性する ALS では、中枢神経由来の RNA の変化を検討する必要があるが、中枢神経由来である髄液中の細胞外 RNA の総量は微量であり、ALS 群で有意な変化はなかった。つまり、ALS の病態に基づかず、微量にしか存在しない中枢神経由来の細胞外 RNA の量的な変化を調べるのみでは、バイオマーカーの確立は困難と思われた。

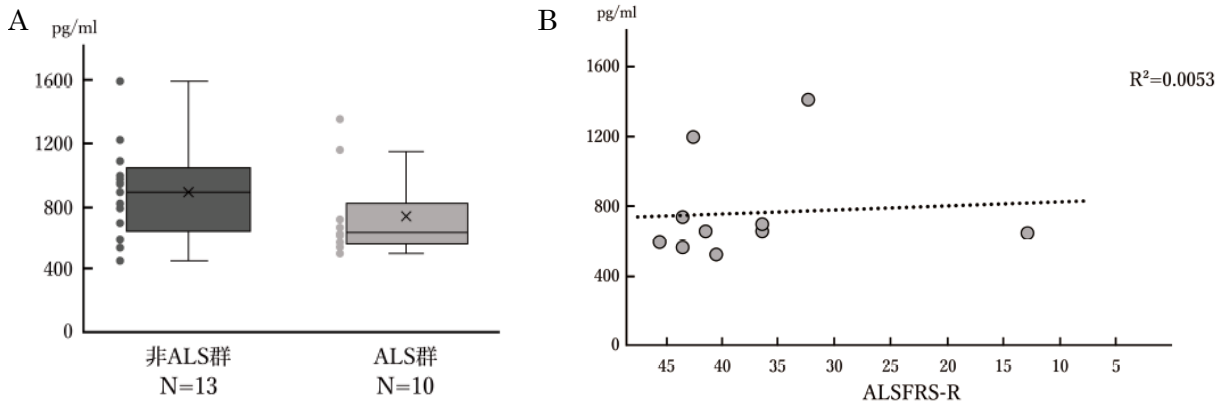


図 2. 髄液中に存在する total RNA 量の比較と ALSFRS-R との相関

A) 髄液中に存在する total RNA 量（ALS 群：N=10、非 ALS 群：N=13）。平均±四分位間範囲で表している。丸印は個々の細胞外 RNA 量をプロットしたものである。

B) total RNA 量と ALSFRS-R の相関（ALS 群：N=10）。波線は近似直線を表している。丸印は個別の細胞外 RNA 量をプロットしたものである。

2. 髄液中の ADAR2 依存性編集部位 site A の編集率

RNA の量的な変化ではバイオマーカーの確立が困難と思われたため、孤発性 ALS で特異的な分子異常に基づき、今まで検討されていない RNA 編集という質的な変化に着目した。我々は、培養細胞系を用いた先行研究で、運動ニューロンに発現し ADAR2 依存性編集部位を含む mRNA を同定し、それらが細胞外 RNA として分泌されていることを発見した［10］。そこで、バイオマーカー候補であるそれらの ADAR2 依存性編集部位を持つ mRNA が、髄液中に存在する細胞外 RNA から検出できるか検討した。髄液中に存在する細胞外 RNA の総量は微量であり、全ての ADAR2 依存性編集部位を持つ mRNA を検出することは出来なかった。検出できた mRNA の中で、非 ALS 群で編集率が高い site A に注目した。ALS 群と非 ALS 群で site A の編集率を比較したところ、ALS 群で有意に編集率が低下していた（ALS 群：82.4～100%、非 ALS 群：95.0～100%、Mann–Whitney *U*-test、*P*=0.024）（図 3）。興味深いことに、非 ALS 群の全ての症例で編集率が 95%以上であり、特異度の高い診断バイオマーカーになる可能性が示唆された。

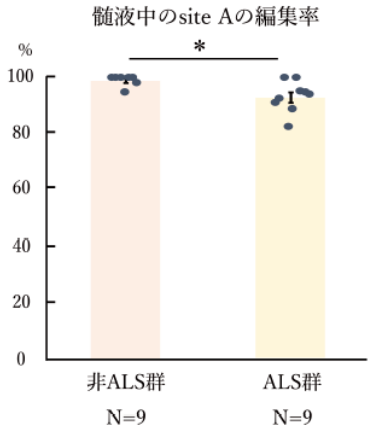


図 3. 髄液中の ADAR2 依存性編集部位 siteA の編集率
ALS 群 : N=9、非 ALS 群 : N=9 である。丸印は個々の細胞外 RNA 量をプロットしたものである。平均値±標準誤差で示す。*P<0.05、Mann-Whitney U-test。

3. 孤発性 ALS 患者における髄液中の site A の編集率と臨床パラメーターとの相関

髄液中の ADAR2 依存性編集部位 site A の編集率が疾患特異的な診断バイオマーカーとなる可能性を示したが、ALSFRS-R や%VC といった臨床パラメーターとの相関を調べることで疾患の進行モニタリングマーカーとなるか検討した。髄液中の site A の編集率と ALSFRS-R の間には、有意な相関は認めなかったが、編集率が低下すると ALSFRS-R が低下する傾向にあった（Spearman の順位相関係数、R^2=0.144、P=0.111）。編集率と%VC の間にも同様に、編集率が低下すると%VC が低下する傾向にあった（Spearman の順位相関係数、R^2=0.1225、P=0.383）。どちらも有意差はないものの、今後症例を蓄積することで有意な相関を示す可能性が高く、髄液中の site A の編集率が疾患の進行モニタリングマーカーとなる可能性を示唆した。

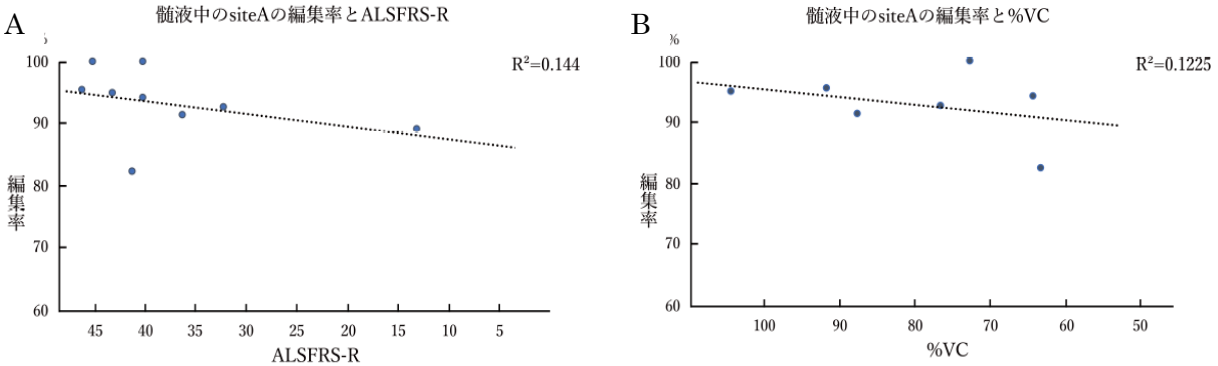


図 4. site A の編集率と ALSFRS-R および%VC との関連
A) 髄液中の site A の編集率と ALSFRS-R（ALS 群 : N=9）。波線は近似直線を表している。丸印は個別の site A の編集率をプロットしたものである。
B) 髄液中の site A の編集率と%VC（ALS 群 : N=7）。波線は近似直線を表している。丸印は個別の site A の編集率をプロットしたものである。

以上の結果より、髄液中 site A の編集率は運動ニューロン内の ADAR2 発現量を反映する可能性が高く、運動ニューロンで ADAR2 発現量が低下している孤発性 ALS の疾患特異的なバイオマーカーとなり得る。現在開発されつつある、孤発性 ALS の ADAR2 発現量低下を標的とした新たな ALS 治療薬が開発された暁には、治療可能な孤発性 ALS を判

別する診断バイオマーカー及び治療効果判定を可能とするバイオマーカーとなるだろう。今後症例数を増やすことで、この予測の妥当性を明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、研究全般にわたり御助言、御協力頂きました東京医科大学脳神経内科特任教授の郭伸先生、筑波大学脳神経内科名誉教授の玉岡晃先生、講師の辻浩史先生には篤く御礼申し上げます。髄液検体の採取を御協力いただいた、筑波大学脳神経内科准教授の石井一弘先生をはじめとするスタッフおよびレンジデントの先生方、東京医科大学脳神経内科教授の相澤仁志先生、茨城県西部メディカルセンターの寺田真先生に深謝いたします。また、茨城県西部メディカルセンターの臨床検査部スタッフの方々には、髄液検体の処理および保存に御協力いただきました、深く感謝いたします。

文　献

1) Hosaka T, Yamashita T, Tamaoka A, Kwak S. Extracellular RNAs as Biomarkers of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2019;20(13) https://doi.org/10.3390/ijms20133148.
2) Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, et al. Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. Neurobiol Dis. 2012;45(3):1121-8. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.033.
3) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, et al. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. Neurosci Res. 2006;54(1):11-4. https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.09.006.
4) Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, et al. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. J Neurosci. 2010;30(36):11917-25. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010.
5) Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. Acta Neuropathol. 2010;120(1):75-84. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0678-x.
6) Hosaka T, Tsuji H, Kwak S. RNA Editing: A New Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurological Diseases. Int J Mol Sci. 2021;22(20) https://doi.org/10.3390/ijms222010958.
7) Akamatsu M, Yamashita T, Hirose N, Teramoto S, Kwak S. The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathology in sporadic ALS model mice. Sci Rep. 2016;6:28649. https://doi.org/10.1038/srep28649.
8) Akamatsu M, Yamashita T, Teramoto S, Huang Z, Lynch J, Toda T, et al. Testing of the therapeutic efficacy and safety of AMPA receptor RNA aptamers in an ALS mouse model. Life Sci Alliance. 2022;5(4) https://doi.org/10.26508/lsa.202101193.
9) Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, et al. Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. EMBO Mol Med. 2013;5(11):1710-9. https://doi.org/10.1002/emmm.201302935.
10) Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, Hirose N, Tamaoka A, Kwak S. ADAR2-dependent A-to-I RNA editing in the extracellular linear and circular RNAs. Neurosci Res. 2019;147:48-57. https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.005.