

digital PCRを用いた筋萎縮性側索硬化症患者 体液中マイクロRNAの検証



北海道大学病院脳神経内科・助教 岩田 育子

【研究概要】

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis：ALS）は運動ニューロンが脱落することで、全身の筋力が低下する疾患です。その終末期には筋萎縮が進行し、食べ物や飲み物を飲み込むこと、及び呼吸を行うことも困難になる神経難病です。主に成人期に罹患し、日本では人口10万人あたり、1-2人に新たに発症します。全体の10%程度に、遺伝子の異常が関連する家族性ALSが存在することが指摘されています。現在、その原因に関して完全な理解には至っておりません。

近年、TDP-43タンパク質が運動ニューロン内に蓄積することが指摘されました。このTDP-43タンパク質の本来の役目は、細胞の中と外を、タンパク質作成の鋳型であるRNAを乗せて往復することです。このような、RNAを乗せる役割を持つタンパク質をRNA結合タンパク質と呼びます。家族性ALSの原因遺伝子には、RNA結合タンパク質の遺伝子異常や、非コード性RNAのリピート数異常伸長によるものが数多く発見されました。以上から、ALSの発症原因の1つとして、RNAを介した異常が注目されるようになりました。

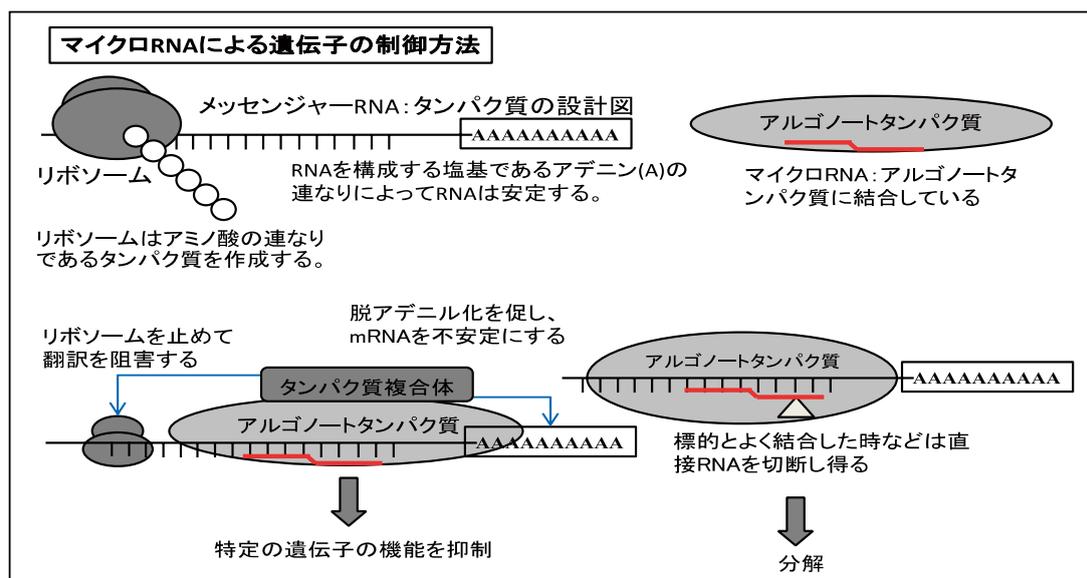


図1：マイクロRNAの概要：主にマイクロRNAによる標的遺伝子の制御方法

ALSの研究に関するもう1つの課題として、診断、疾患進行や治療効果の指標として活用できるバイオマーカー開発があります。特に、病態と関連し、ALS特有のものとして十分満足できるバイオマーカー物質はこれまで特定できていませんでした。私は、ALSの新規バイオマーカー候補として、RNA

の中でも極めて短く、それ自身がタンパク質の鋳型になるのではなく、鋳型であるメッセンジャーRNAに対して制御する機能を持つ特殊なRNAであるマイクロRNAに着目しました（図1）。ヒトではおおよそ2000種のマイクロRNAが存在していると言われており、このどれがALSに関連が深いのか、患者の実際の血液及び脳脊髄液を用いて検討しました。

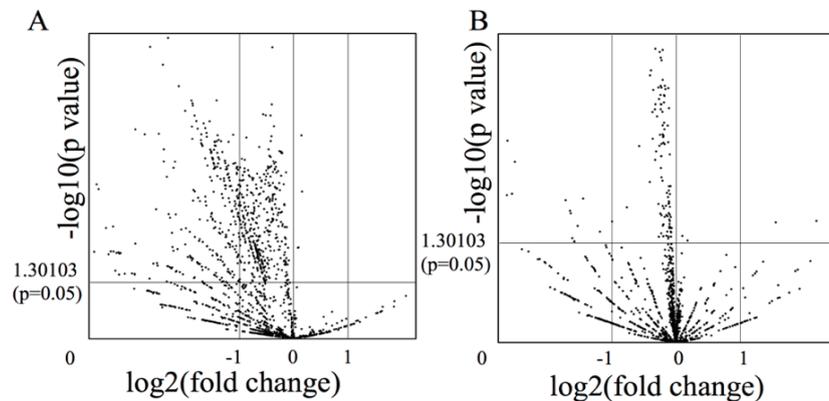


図2：ALS患者のマイクロRNAプロファイル：右上ほど増加し、左上ほど減少している。

具体的には、同時にたくさんの遺伝子などを比較検討する技術である、マイクロアレイを用い、ALS患者で特に増加、減少しているマイクロRNAを検出しました（図2）。次に、逆転写PCRを用いて、再現性があるのか、またALSの進行を加速させるものがないか、あるいはその逆に遅らせるものがないかを検討しました。結果として、いくつかのマイクロRNAがALSの発症や、進行に影響することがわかりました。

この結果を検証するため、ALS患者さんから頂いた血液150例、健常の方からご提供を頂いた血漿150例、ALS患者さんから頂いた脳脊髄液80例、それ以外の患者さんから頂いた脳脊髄液80例を使用し、デジタルPCRによる解析を現在進めています。血漿と脳脊髄液より、薬剤を用いてRNAを抽出し、さらに、それを鋳型として合成DNAを作成します。今回使用するデジタルPCRでは、非常にたくさんの微細な枠に少数の合成DNAが入るか、あるいは入らないような濃度に設計しています。合成DNAは枠の中で増幅し、通常のPCRと同じように、ある程度増幅すると、光ることで検出できるようになります。そのため、光らなかった枠と光った枠の数を数えることで、存在していた合成DNAの量を計算します。この方法は、血液や脳脊髄液に存在するマイクロRNAのような極めて微量のRNAを測定する上で、最適な方法と考えられます。

現在、国内外の他の研究においても特定のマイクロRNAがALS患者の体液中で変動を示すことが報告されています。これまでに特定されてきた数種類のマイクロRNAについて、実際の患者さんの診断や進行の予測に役立っているため、より安定した測定システムを開発する必要があります。私は、新しい遺伝子検出システムである、デジタルPCRを用いて、これらの候補の中で最も患者さんの診断に役立てられるマイクロRNAは何なのか、また、その抑制対象となる遺伝子によって治療へも役立てたいと考えています。