

論 文 内 容 要 旨

Circulating microRNAs as biomarkers for evaluating
the severity of acute spinal cord injury

(急性期脊髄損傷における血液バイオマーカー
としてのマイクロ RNA の探索)

Spinal Cord, 52(8): 596-600, 2014.

主指導教員：越智光夫教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段秀樹教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：安達伸生准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

蜂須賀 晋

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

脊髄損傷の治療研究において、急性期～亜急性期では実験的に有効性が確認されている治療アプローチが数多く存在するが、慢性期では動物実験レベルでも有効な治療法は存在しない。脊髄損傷では、機械的な一次損傷に引き続いて二次損傷が拡大していたり、脊髄の修復機構が働いていたりする急性期に治療介入するのが、現時点では最も実現性が高いと考えられる。しかし急性期治療の最大の難点は、脊髄損傷の予後予測の困難さである。脊髄損傷では損傷の程度がそれほど著明では無くても、spinal shock などの影響で一時的に著明な麻痺が出ることもあり、急性期には同等の麻痺であっても、機能改善にはバラツキがあり、急性期の治療介入による効果判定が困難なことが、新規治療の臨床応用の阻害要因となっている。そこで急性期に重症度を判定するための研究が行われるようになっており、その一つが血液バイオマーカーである。現在のところ神経組織に特異的な蛋白の血液中への流出をとらえる試みがなされているが、ELISA 法で蛋白測定を行う方法で、その感度は高いとは言えず、血液脊髄関門を通過できない蛋白を見ているので、その結果は神経の損傷だけでなく血液脊髄関門の機能に影響をうける。そこで、癌などの他疾患のバイオマーカーとして注目が集まっている microRNA (miRNA) に着目した。miRNA は細胞から exosome と呼ばれる小胞顆粒に包まれて血液中に放出されるが、その小さなサイズから血液脊髄関門の影響を受けず、PCR による高感度な測定が可能である。本研究では、脊髄損傷の重症度に関連する血清 miRNA の探索を目的とした。

方法は C57BL/6 マウスを用いて第 10 胸椎椎弓切除を行い、圧迫強度を調節することが出来る Infinite Horizon impactor を用いて第 10 胸椎レベルの脊髄を圧迫してマウス胸髄損傷モデルを作成した。50kdyn の圧迫力を加えた軽症群と、70kdyn の圧迫力を加えた重症群の 2 種類を作製し、椎弓切除のみを行った sham 群と何も処置しない normal 群の 4 群で比較検討した。脊髄機能評価として Basso mouse scale (BMS) を損傷後 3、12、24 時間および、3、5、7、14、21、28、35、42 日に測定した。損傷後 3、12、24 時間および 3、7 日に血清と脊髄損傷部を採取し RNA を抽出した。初めに損傷後 12 時間の血清で TaqMan low density array analyses (TLDA) による miRNA の網羅解析を行ってバイオマーカーの候補を絞り、さらに real-time PCR で経時的な発現評価を行った。また、炎症関連 miRNA である miR-146a-5p および miR-155 についても発現を測定した。

BMS スコアの結果は損傷後 3 時間では軽症群、重症群ともに 0 (完全麻痺) であったが、損傷後 12 時間以降で軽症群の方が有意に改善した。TLDA の結果で重症群 > 軽症群 > sham 群の順で発現が高く、normal 群と sham 群とで発現に差がなかった miR-9*、miR-219 および miR-384-5p をバイオマーカーの候補とした。血清の real-time PCR では、miR-9* は損傷後 3、12、24 時間で、miR-219 血清は損傷後 12、24 時間で、miR-384-5p は損傷後 3、12 時間で、重症群 > 軽症群 > sham 群の順に有意に発現が高く、normal 群と sham 群とで発現に有意差を認めなかった。miR-9* と miR-384-5p は受傷後 3 時間、miR-219 は受傷後 12 時間で発現が最も高かった。脊髄損傷部の組織から抽出した RNA では、受傷後 12 時間で最も発現が高く、軽症群と重症群は sham 群よりも有意に発現が高かったが、軽症群と

重症群との間に発現に差がなかった。炎症関連 miRNA である miR-146a-5p および miR-155 では、normal 群より発現が高かったが、重症度に関連した発現傾向は認められなかった。

血清中の miR-9*、miR-219 および miR-384-5p は損傷後 3~24 時間の急性期バイオマーカーとして有用であると考えられた。これらの発現は normal 群と sham 群とで差がなく、骨格筋や骨の損傷による影響を受けていないと考えられ、炎症関連 miRNA の発現とも関連していなかったことから、脊髄の損傷に特異的な発現変化と考えられた。