

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	蜂須賀 晋
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	青山 裕彦	
審査委員	教授	栗栖 薫	
審査委員	准教授	丸山 博文	
〔論文審査の要旨〕			
<p>脊髄損傷の治療研究において、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が、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。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、最も実効性が高いと、現在、考えられている。急性期治療における最大の課題は、脊髄損傷の予後予測である。脊髄損傷では損傷の程度がそれほど著明では無くても、脊髄ショックなどの影響で一時的に著明な麻痺が出ることがあり、急性期には同等の麻痺であっても、その後の機能改善にはばらつきがある。これが、急性期の治療介入による効果の判定を困難にし、新規治療の臨床応用の妨げとなっている。そこで急性期に重症度を判定するための研究が始まっており、その一つが血液バイオマーカーである。現在、神経組織に特異的な蛋白質の血液中への流出を ELISA 法で測定する試みがあるが、その感度は高いとは言えず、また、血液脊髄関門を通過できない蛋白質を見ているので、その結果は神経系の損傷だけでなく血液脊髄関門の機能傷害の影響も受ける。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マイクロ RNA (miRNA) に着目した。miRNA は細胞からエクソソームと呼ばれる小胞に包まれると血液脊髄関門を通過できるようになり、血液中に放出される。血中の miRNA は 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 を探索した。</p>			

マウス胸髄損傷モデルは以下のように作成した。C57BL/6 マウスの第 10 胸椎椎弓を切除し、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た。椎弓切除後 50kdyn の圧力を加えた軽症群と、70kdyn の圧力を加えた重症群、椎弓切除のみを行ったシャム群と何も処置しない正常群の 4 群で比較検討した。

脊髄損傷後 3, 12, 24 時間および 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 日に Basso mouse scale (BMS) を用いて脊髄機能を評価した。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。

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。まず、損傷後 12 時間の血清で TaqMan low density array analyses (TLDA) による miRNA の網羅解析を行った。その結果、重症群>軽症群>シャム群の順で発現が高く、正常群とシャム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。ついで、real-time PCR で経時的に発現を評価した。血清では、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>シャム群の順に有意に発現が高かった。正常群とシャム群とでは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、軽症群と重症群はシャム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有意差はなかった。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が、正常群型と比べて有意に低値である以外、重症度に関連した発現の差は認められなかった。

以上のことから、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。これらの発現は正常群とシャム群とで差がなく、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。このバイオマーカーの使用により、脊髄損傷後急性期の治療の有効性がより正確に評価できるようになり、新規治療法、治療薬の開発に大きく貢献するものと考えられる。

以上の結果から、本論文は脊髄損傷に対する治療の有効性を評価する臨床試験法を示しており、整形外科の発展に貢献することが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。