

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	古谷 元樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 RNA-Sequencing Analysis Identification of Potential Biomarkers for Diagnosis of Sarcopenia (RNA配列解析によるサルコペニア診断のための潜在的バイオマーカーの同定)			
論文審査担当者			
主 査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	講師	味八木 茂	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>サルコペニアは加齢による筋力の減少および筋力の低下と定義される老年病である。社会の高齢化に伴いその罹患者数は増加し，日常生活動作への影響や転倒リスクだけでなく，循環器疾患など様々な分野での疾患の重症化や生存期間にも影響し，多くの診療科で介入を必要とする疾患として注目されている。サルコペニアの診断は，臨床的背景を踏まえた基準が広く用いられているが，病態の複雑性のため診断や病態の評価に関するバイオマーカーは明らかではない。そこで本研究では，Asia working group for sarcopenia (AWGS) 2019 に基づいて診断されたサルコペニア患者 52 例(女性 22 例，平均年齢 79.9 歳)，健常者 62 例(女性 54 例，平均年齢 75.2 歳)の末梢血から取得した PBMC(peripheral Blood Mononuclear cells)における全 RNA 配列解析(RNA-seq)から網羅的な遺伝子発現解析，ならびに臨床検査項目との関連解析からバイオマーカー候補の探索を実施した。</p> <p>まずサルコペニアの臨床診断基準に含まれない 52 項目の臨床検査(血液検査，社会背景，運動機能，骨密度など)を用いた解析(年齢，性別，BMI で調整したロジスティック回帰)を行った。その結果，歩幅がオッズ比 0.14，Bonferroni 補正した p 値 0.14 を示し，顕著にサルコペニア患者で低下していることを同定し，歩幅をバイオマーカー候補として選定した。</p> <p>RNA-seq の結果を用いて行なった遺伝子発現変動解析からは，遺伝子発現変動遺伝子(Differential expressed gene [DEG])の定義を False discovery rate (FDR) &lt;0.05，<math> \log_2(\text{Fold change})  &gt; \log_2(1.2)</math>としたところ 168 の DEGs を同定することができた(upregulated 100，down regulated 68)。その中で特に顕著な DEGs を FDR &lt;0.05，<math> \log_2(\text{Fold change})  &gt; \log_2(2)</math>としたところ 6 遺伝子 (<i>FAR1</i>，<i>GNL2</i>，<i>HERC5</i>，<i>MRPL47</i>，<i>NUBP2</i>，<i>S100A11</i>) で特に強い関連が認められ，これらをバイオマーカー候補として選定した。</p> <p>続けて，得られた 168 個の DEGs を用いて遺伝子オントロジー(GO)を用いたエ</p>			

ンリッチメント解析を実施したところ6つの Molecular function に関わる Gene Ontology (GO) term が統計学的有意差 (FDR < 0.05) を示した。その中で特に GO:0003779 Actin binding がサルコペニアの病態に強く関連すると考えられ、この GO term を構成している遺伝子群に対してタンパク質相互作用解析を施行したところ特に *FLNA* と *MYH9* という2つの遺伝子が重要なハブ遺伝子であることが判明 (Degree >=30, Between centralities > 2000) し、この2つの遺伝子もサルコペニアバイオマーカー候補として選定した。

また、サルコペニアは加齢に伴い筋力の減少および筋力の低下を伴う老年病であり、老年病の多くが immunosenescence (免疫老化) を背景としていることが指摘されている。そこで今回我々は、サルコペニアに対する免疫細胞に関する検討も行なったが、免疫細胞分画およびB細胞/T細胞受容体のレパトア解析において有意差を示すものは認めることができなかった。

上記の解析結果を用いて、診断予測モデルの構築を行った。すなわち歩幅, *FAR1*, *GNL2*, *HERC5*, *MRPL47*, *NUBP2*, *S100A11*, *MYH9*, *FLNA* の9つのバイオマーカー候補を用いてランダムフォレストという機械学習アルゴリズムの一つを用いて予測モデルを構築した。その結果、年齢、性別をベースにした場合、歩幅, *HERC5*, *S100A11*, *FLAN* の4つのバイオマーカーを用いた場合、Receiver Operating characteristic (ROC) curve における Area under the curve (AUC) が 0.91 (95% confidential interval [CI]: 0.78 - 0.95) と高い AUC を示し年齢、性別だけのベースモデルよりも優れた指標であることを示すことができた (Welch's t-test  $P < 0.001$ )。同様の手法で年齢、性別、BMI をベースモデルとし、バイオマーカー候補を選定した場合も、歩幅, *HERC5*, *S100A11*, *FLAN* の4つのバイオマーカーを用いた場合が最も良い AUC (0.95, 95% CI: 0.84 - 0.99) を示すことを確認した (Welch's t-test  $P < 0.001$ )。高齢者の肥満評価は肥満パラドックスやサルコペニア肥満など、議論が多いが、この結果から、これらのバイオマーカーはサルコペニア診断により有用なものあるということが示唆された。

qPCR による検討でも、実際に RNA-seq の結果と同様に *HERC5*, *FLNA*, *S100A11* はサルコペニア患者で上昇しているという傾向を確認することができ、将来的なバイオマーカーとして有用である可能性を示した。また Myoblast, Myotube でこれらの遺伝子の発現を確認したところ、それぞれ Myoblast, Myotube で発現の程度に差はあるものの筋線維で発現することを確認でき、生体内でも筋との関わりはあると推察された。同定された3つの遺伝子は先行研究においても、筋炎や動脈硬化との関連が報告されており、サルコペニアの発症において炎症が大きな役割を果たしている可能性を改めて示した。さらに、これらの遺伝子は血中だけでなく、筋細胞でも発現していることを確認できたことから、これらのバイオマーカーはサルコペニアの診断に有効なだけでなく、筋肉量・筋力の低下をきたす疾患であるサルコペニアの病態メカニズムの解明にもつながる可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究により RNA-seq を通したバイオインフォマティクス解析の結果、新たなサルコペニア診断に有効なバイオマーカー候補 (歩幅と3つの遺伝子 [*HERC5*, *S100A11*, *FLNA*]) を同定した。本研究で同定したバイオマーカーは、従来の臨床評価項目を中心としたサルコペニアの診断に新たな選択肢を提供できるだけでなく、サルコペニアの発症メカニズムの解明やサルコペニア予防の研究等に貢献すると期待されるという点で、臨床的に意義のある研究である。

よって審査委員会委員全員は,本論文が申請者:古谷 元樹に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。