

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：RNA プロセッシング異常を標的とした筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカーの開発
2. 研究開発代表者： 郭 伸（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター臨床医工学部門）
3. 相手国研究代表者：Erez Levanon（Bar-Ilan University（イスラエル））
4. 研究開発の成果

ALS は原因未解明の致死性神経難病であり、有用な治療法、バイオマーカーを欠いている。ALS の 90% を占める孤発性 ALS の大多数に見出される運動ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット GluA2 の RNA editing 異常は病因関連分子異常であり、神経病理学的指標である TDP-43 病理を引き起こす原因である。両者は RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の進行性の発現低下が引き起こしていることが明らかになった。本研究計画は、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている ADAR2 発現低下を体液中 RNA により検出することで、ALS のバイオマーカーを開発することを目的としている。

RNA やタンパクは細胞外に放出されることが知られているが、体液中 RNA が有用なバイオマーカーであるための条件としては、ADAR2 部位を持ち活性低下を特異的に反映すること、運動ニューロンから分泌される RNA であること、ADAR2 発現減少による運動ニューロン死の過程で分泌量に変化する RNA もしくは ADAR2 による RNA 編集部位の編集率が有意に低下する RNA であること、体液中でも安定に存在すること、などの特徴をもつことが要求される。

我々は ALS の分子病態モデル動物であるコンディショナル ADAR2 ノックアウト (ADAR2^{flox/flox}/VChAT-Cre, AR2) マウスを開発している。このマウスは運動ニューロン選択的に ADAR2 を欠損しているため、発現する RNA の ADAR2 部位は RNA 編集を受けない。この AR2 マウスの運動ニューロンに発現する RNA を野生型マウス運動ニューロンに発現する RNA を比較することにより、運動ニューロンに発現する ADAR2 部位を有する RNA を網羅的に検索することができる。そのため、レーザーマイクロディセクターで単一運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出し、ALS のモデルマウスであるコンディショナル ADAR2 ノックアウト (ADAR2^{flox/flox}/VChT.Cre; AR2) マウス由来のものと野生型マウス由来のものとを比較することで、ADAR2 部位をもつ RNA の同定を行った。日本側では単一運動ニューロン組織の切り出し、RNA 抽出を行い、RNA-seq 解析を行った。SMARTer Strand RNA-seq Kit (Clontech Laboratories, Inc) を用いた RNA シークエンス法の採用で、解析に必要な組織量をリボソーム RNA 除去後 RNA 量として 100pg~100ng に抑えることができた。各群 3 匹より一匹から 2000 個強の単一運動ニューロンを切り出し、それぞれにつき RNA-seq を行った。イスラエル側ではこの結果を基に ADAR2 部位の同定、RNA 編集率の比較を行った。RNA 編集部位はゲノム上の塩基と転写物中の塩基とが異なることがその指標になるが、転写エラー・ADAR1 により触媒される部位の除外、生理的条件下で編集型が占める割合が 10%以上、の条件に合致したバイオマーカー候補 RNA を選別した。その結果 40 種以上の部位でモデルマウス由来 RNA と野生型マウス由来 RNA に有意な編集率の違いが認められ、運動ニューロンに発現する RNA における ADAR2 部位と特定した。さらに、マウス運動ニューロンから得られたこれら候補 RNA と相同の RNA をヒト由来培養細胞で発現を確認し、ADAR2 のノックダウン、不活性化、過剰発現により ADAR2 部位であることを確認した。また、これら候補 RNA が体液中に分泌されることを、ヒト由来培養細胞の培養上清、ヒト血清、ウマ脳脊髄液で確認し、ADAR2 部位の編集率を測定している。