

エクソソーム内包 miRNA-mRNA-オミックス解析から薬物反応を探る

吉村玲児

産業医科大学医学部 精神医学

【研究の背景】

miRNA は、平均 22 ヌクレオチドで形成される小さなノンコーディング RNA(ncRNA) 分子である。22 ヌクレオチドで形成される。標的メッセンジャーRNA(mRNA)の 3' 非翻訳領域(UTR)に結合する。(mRNA)の 3' 非翻訳領域(UTR)に結合し、翻訳抑制を引き起こし、結果として標的 mRNA の発現を抑制する。miRNA は、糖尿病、心血管疾患、癌、感染症などにおいて、発現量が変動することが報告されている。さらに miRNA は、精神疾患や神経変性疾患にも関与している。miRNA は遺伝子発現の制御機構に関与しており、神経疾患や神経変性疾患に深く関与していることが示唆されている。精神疾患の神経生物学的基盤に深く関与していることが示唆されている、うつ病(MD)や統合失調症などである。最近の研究では、miRNA が神経可塑性、神経新生、ストレス応答において重要な役割を果たしていることが示されている。細胞外小胞(EVs)とは、細胞から分泌される膜小胞の総称である。エクソソームやマクロベシクルなどのよく知られた例が含まれる。エクソソームは、エンドサイトーシスによって形成される 40~100 nm の脂質二重層構造を持つ小胞で、多くの細胞から分泌される。多数の細胞から分泌される。エクソソームは、唾液、血液、母乳、羊水、尿などのヒトの体液中に広く分布していることが報告されている。エクソソームの脂質二重鎖構造は miRNA を保護し、細胞外への安定した循環を可能にしている。miRNA はエクソソームを介して他の細胞に輸送され、そこで受容体の生物活性を制御すると考えられている。受容細胞の生物学的活性を制御すると考えられている。このように、エクソソームを含む EV は細胞外で安定しており、MD の新しいバイオマーカーとして広く研究され期待されている。

【目 的】

本研究の目的は MD の重症度と相関するバイオマーカーを同定する目的で、血液中に存在する EV 中の miRNA の発現プロファイルを検討し、さらにインシリコ解析を行い、他の研究グループによって in vitro で検証された miRNA の標的を同定することである。

【方 法】

対象者

2018 年 9 月から 2020 年 3 月の間に、日本の産業医科大学病院の外来患者または入院患者として、MD の参加者を募集した。MD 患者は、20 歳から 65 歳までの外来患者または入院患者で、inclusion criteria は、診断と統計マニュアル第 5 版(DSM-5)に従った MD の診断基準を満たした。また、20~68 歳の 284 人からなる健常対照群。糖尿病、心血管疾患、悪性腫瘍、感染症、精神疾患の既往のない 20~68 歳の 284 人からなる健常対照群対照群とした。このサンプルは、まだ実施されていない将来の研究のために集められたものである。対照群対照群は特定の企業に雇用された人々で構成された。喫煙習慣、飲酒量、学歴などの特定の人口統計学的データは、この分析では利用しなかった。本研究は、産業医科大学の倫理審査委員会によって承認された。ヘルシンキ宣言(UOEHCRB21-083)に従って承認された。すべての参加者は、書面によるインフォームド・コンセントを提供した。

心理測定評価

経験豊富な精神科医 1 名が、参加者全員の抑うつ症状について 17 項目の HAMD を評価した。うつ病の重症度は、HAMD スコアを用いて以下のように分類された。軽症(8~13 点)、中等症(14~18 点)、重症以上(19 点以上)であった。

検査方法

MD と診断された患者から 10mL の血液を採血管に採取した。

健常人からは 2mL の血液を採取した。血液サンプルは室温で 5 分間以上ゆっくりと回転させた。凝固確認後、血液の凝固を確認した後、4°C で保存し、4 日以内に以下の手順を実施した。チューブを 3000rpm で 10 分間遠心した後、上清血清を -80°C で保存した。

血清からの EV の単離と EV 中の miRNA の精製

可溶化した血清(0.5 mL)を生理食塩水(1 mL)で希釈し、全量(1.5 mL)を EV から分離した。(1.5mL)を 2.5mL シリンジに吸引した。220nm のシリンジフィルター(SFPES013022N; Membrane Solutions, Auburn, WA, USA)と 50 nm(SF16008; TISCH Scientific, Cleves, OH, USA)を順にシリンジに接続した。1 秒間に 1 滴以下の速度でプランジャーを押し、シリンジフィルターを通過させた。その後、2mL の生理食塩水を mL シリンジに吸引し、接続したシリンジフィルターに装着した。シリンジフィルターを 1 秒間に 1 滴以下の速度でプランジャーを押し洗淨した。1 ミリリットルの mL シリンジに ISOGEN(Nippongene, Ajman, United Arab Emirates)を 1mL 吸引した。

洗淨した 50nm シリンジフィルターに接続した。プランジャーを上下に動かしを上下させてシリンジフィルターから空気を抜き、サンプルを 1 分間回収した。試料の入ったチューブを 1 分間ボルテックスした。クロロホルム(200 μ L)をチューブに加え、ボルテックスで混合した。ボルテックスミキサーで 15 秒間混合し、室温で 2~3 分間放置した。その後 12,000 \times g で 15 分間遠心した後、上清 450 μ L と 2-プロパノール 450 μ L をボルテックスミキサーで混合した。全量(900 μ L)を NucleoSpin-miRNA-Plasma kit (MACHERY-NAGEL, Düren, Germany)に通した。次に NucleoSpin-miRNA-Plasma をキットのプロトコルに従ってカラムに固定化した。50 μ L の H₂O をカラムに 2 回通すことで miRNA を抽出した(総容量 100 μ L)。総量 100 μ L)。10 μ L の 3M 酢酸カリウム(pH5.5)、100 μ L の 2-プロパノール、およびペレットペイント 1 μ L を miRNA 抽出チューブ 100 μ L に加え、21,000 \times g (15,000) で遠心した。21,000 \times g(15,000rpm)で 15 分間、4 °C で遠心した。ペレットを 70%エタノール 250 μ L で洗淨後、風乾した。エタノール 250 μ L で洗淨後、風乾し、マイクロアレイ解析まで-80 °C で保存した。

miRNA を安定に発現する細胞の形成と全 RNA の精製

不死化ヒトドパミン作動性ニューロン前駆細胞株(LUHMES 細胞, Cat. T0284)、不死化ヒトミクログリア(Cat.No.T0251)、および不死化ヒトアストロサイト(Cat.No.T0280)は、Applied Biological Materials Inc、COS1(Cat.No.CRL-1650)は American Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入した。COS1(Cat.No.CRL-1650)は American Type Culture Collection(米国バージニア州マナサス)から購入した。miRNA を安定に発現している細胞は、生物学的なレンチウイルスを用いて樹立した。つまり pSIH1-H1-copGFP(SI501A-1、SBI: System Biosciences, Palo Alto, CA, USA)を用いて構築した。このプラスミドに、hsa-miR-2277-3p および hsa-miR-6813-3p を合成するオリゴヌクレオチドをこのプラスミドに H1 プロモーターの下流、BamHI-EcoRI 部位に挿入した。インサートを含まないベクターをコントロールとして用いた。ウイルスは COS1 細胞 pPACKH1 レンチベクター HIV パッケージングキット(LV500A-1、SBI)を用いてウイルスをパッケージングした。ウイルスを含む細胞培養液を 0.45 μ m のシリンジフィルターに通し、神経前駆体の培養液に加えた。神経前駆細胞、アストロサイト、マクログリアの培養液に加えた。細胞 miRNA を発現している細胞をピューロマイシンで 2 週間以上培養して選択した。その結果、100%の細胞が緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現していることが確認された。hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-227-3p の発現を確認するために、さらに RT-qPCR 実験を行った。hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-227-3p をトランスフェクトした細胞では、miRNA が過剰発現していることが確認された。hsa-miR-6813-3p または hsa-miR-227-3p でトランスフェクトした細胞において、miRNA が過剰発現していることが確認された。全 RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて精製した。精製した全 RNA は、2100 Bioanalyzer System (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて高純度であることを確認した。このように非常に厳密な実験プロトコルに準じて本実験は行われた。

マイクロアレイ解析

miRNA のマイクロアレイ解析は、2565 個の miRNA を含む Human miRNA Oligo Chip 4 plex (TORAY, Tokyo, Japan)を用いて、既述のように行った。対照群における miRNA アレイ解析のために、合計 300 の血清サンプルを採取した。これら 300 検体のそれぞれを、プールせずに個別に解析した。このうち 284 サンプルが最終データセットに残され、残りの 16 サンプル

は以下の理由で除外された。残りの 16 サンプルは、サンプル自体またはアレイチップのいずれかに欠陥が見つかったため除外された。マイクロアレイ解析 mRNA のマイクロアレイ解析は、Human Oligo Chip 24,460 プローブセットを含む 25k セット (TORAY) を用いた。各 miRNA および mRNA は、グローバル正規化法検出されたシグナル強度の中央値 25 に調整した。4.7. 逆転写および定量的リアルタイム PCR 解析 (RT-qPCR) miRNA を含む全 RNA は、miRNeasy Kit (217084; Qiagen, Venlo, オランダ) で精製した。hsa-miR-2277-3p, hsa-miR-6813-3p, および空の miRNA で安定的にトランスフェクトした神経前駆細胞、ミクログリア、およびアストロサイトから精製した。RT-qPCR アッセイは、製造業者の説明書に従って行った。プライマーセットは以下の通りである: hsa-miR-2277-3p に対する 479594_mir, hsa-miR-6813-3p に対する 480391_mir, および 001973 U6 snRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。値は U6 snRNA の値で正規化した。遺伝子発現の定量には比較サイクルタイム法を用いた。発現を定量した。すべてのサンプルは、各実験において単一で解析した。

候補ターゲット遺伝子の選択

正規化マイクロアレイのデータ解析は、Gene Spring GX (Agilent Technologies Inc. (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)) を用いて解析した。神経前駆細胞、アストロサイト、およびミクログリアはコントロール細胞と比較された。発現に 2 倍以上の差があるものを標的遺伝子候補とした。miRNA と標的の相互作用を包括的に理解するために、TargetScan™ データベースを利用した。miRNA の hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p を入力し、予測される標的遺伝子を抽出した。次に、これらの予測された標的遺伝子をマイクロアレイで得られた結果とクロスリファレンスした。マイクロアレイで得られた結果と照合し、重複や潜在的な不一致を特定した。

GO とパスウェイのエンリッチメント解析

実験的 mRNA アレイ解析から得られた候補標的遺伝子の潜在的機能を予測するために、mRNA アレイ解析から得られた候補標的遺伝子の潜在的機能を予測するために、Metascape (<https://metascape.org/>) を使用した。各遺伝子をジーンオントロジー (GO) に基づいてアノテーションし、パスウェイ濃縮解析を行った。パスウェイ濃縮解析を行った。Metascape はウェブベースのツールで、実験者が強力な計算解析パイプラインを適用して大規模データセットの解析と解釈を行えるように設計されている。大規模データセットの解析と解釈を可能にするように設計されたウェブベースのツールである。GO の結果は、 $p < 0.01$ の閾値で統計的に有意であった。Metascape による解析の $-\log_{10}(p \text{ 値})$ に基づいて上位 20 位がランク付けされた。Metascape では、Benjamini-Hochberg 法を用いて FDR 補正を行い、補正後の p 値を採用した。Wikipathways を用いたパスウェイ解析は Gene Spring GX を用いた。パスウェイ解析は、 $p < 0.05$ の閾値で統計的に有意とみなされた。

統計

統計解析は、R (R Foundation for R) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (埼玉医科大学、自治医科大学、ウィーン、オーストリア) を用いて行った。統計解析は、R (R Foundation for Statistical Computing, Saitama, Japan) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Vienna, Austria) を用いて行った。統計解析は、R (R Foundation for Statistical Computing, Saitama, Japan) の GUI である EZR を用いて行った。さらに、R Commander の修正版は、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するように設計された。正規分布データは平均値 ± 標準偏差、非正規分布データは中央値 (四分位偏差)、カテゴリー変数はカウント (パーセンテージ) として表示される。

カウント (パーセンテージ) で示した。カテゴリーカルデータの比較にはカイ二乗検定を使用した。3 群間の比較ではうつ病の重症度に正規性が認められなかったため、miRNA 発現量の群間比較には Kruskal-Wallis 検定を適用した。また Mann-Whitney U 検定を対照群とうつ病群の比較に用いた。統計的有意性は $p < 0.05$ の閾値で決定された。注意すべき点は本研究では単変量解析を行った。多変量解析は、性別、年齢、投薬量を含む共変量で調整したものである。MD 群のサンプルサイズが小さかったためである。偽発見率 (FDR) 補正を行った。この FDR 補正は、JMPpro の Response Screening 機能を用いて行った。この FDR 補正は、一元配置分散分析 (ANOVA) に基づく JMPpro の Response Screening 機能を使って実行された。

【結 果】

患者の特徴

本研究では、34 歳から 63 歳の MD と診断された 16 人の患者を登録した (Table 1)。平均年齢は 50.13 歳であった。

MD 群の平均年齢は 50.13 歳で、参加者の 50%が女性であった。平均 HAMD スコアは 16.50 点であった。3 人の参加者は軽症うつ病であった(年齢中央値、53.0 歳、HAMD12.0 点)、10 人が中等度うつ病(年齢中央値 48.5 歳、HAMD16.0 点)であった(HAMD16.0 点)、3 人が重度うつ病(年齢中央値 49.0 歳、HAMD23.0 点)であった、23.0 点)であった。年齢($p=0.555$)、性別($p=0.354$)に有意差はなかった。軽症うつ病群、中等度うつ病群、重症うつ病群の間に有意差はなかった。16 人中 12 人が抗うつ薬を、10 人がベンゾジアゼピン系薬剤を服用していた。健常対照群には 284 人が登録された。(男性 209 人(87.08%)、女性 31 人(12.92%)であった。対照群の年齢分布は、平均年齢は 32.89 歳、標準偏差は 10.36 歳であった。年齢範囲は第 1 四分位が 24 歳、中央値は 32 歳、第 3 四分位は 39 歳であった。EV 中の hsa-miR-6813-3p、hsa-miR-2277-3p、hsa-let-7f-1-3p の発現はうつ病の重症度の増加とともに減少した。本研究では、EV を血清および細胞培養液からナノ濾過によって単離した。この方法で単離された EV は、透過型電子顕微鏡(TEM)で球状であることが確認された。EV の直径は、動的光散乱法(DLS)により、 ~ 170 nm であった。EV には、ウェスタンブロッティングで確認されたように、CD9、CD63、CD81、EpCAM タンパク質が含まれ、Agilent 2100 Bioanalyzer で明らかにされたように、30 bp 未満の miRNA が含まれていた。MD の 16 症例で miRNA の発現レベルを解析したところ、**Table S1** に示すように 28 の miRNA で有意差が認められた($p < 0.05$)。

群間比較

HAMD スコアで重症度を比較すると、25 の miRNA で重症度の変化はみられなかった。

hsa-miR-6813-3p、hsa-miR-2277-3p、および hsa-let-7f-1-3p は、HAMD スコアに基づいて、重症度の増加とともに有意に発現が低下した。HAMD スコアに基づくと、重症度が高くなるにつれて、hsa-miR-6813-3p および hsa-let-7f-1-3p は有意に低下した。さらに MD 患者と健常対照者を区別するために、3 つの比較 miRNA のサブグループ解析も行った。この解析結果を健常対照と比較すると、以下のような結果になる。

hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p が MD 患者において有意に発現低下している。hsa-miR-6813-3p および hsa-miR-2277-3p は、MD 患者において有意に発現低下していた。

重要なことは、 p 値は FDR 補正後も有意であった。しかしながら、hsa-let-7f-1-3p では有意差を示さなかった。これらの結果は、hsa-miR-6813-3p および hsa-miR-2277-3p の低発現は、MD の重症度と有意に関連していることが示唆された。hsa-miR-6813-3p および hsa-miR-2277-3p の発現レベルは、MD のうつ病重症度の増加とともに有意に低下した。パスウェイの濃縮解析から、hsa-miR-6813-3p はグルココルチコイド受容体と γ -アミノ酪酸受容体のシグナル伝達に関与している可能性がある。さらに、hsa-miR-2277-3p はドーパミン作動性神経経路に関与している。さらに解析を進めたところ、hsa-miR-6813-3p の発現量と hsa-miR-6813-3p(スピアマンの順位相関係数 $= -0.62$, $p=0.0104$)と hsa-miR-2277-3p(スピアマンの順位相関係数 $= -0.671$, $p = 0.00446$)と、HAMD スコアで測定されたうつ病の重症度であった。これは、うつ病の重症度が上昇するにつれて、これらの miRNA の発現が減少することを示唆している(**Figure 1, Figure 2**)。

hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の標的遺伝子予測

MD 患者において、血清 EV 中の hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p が有意に減少していた。そこで、神経前駆細胞、ミクログリア、アストロサイトこれら miRNA を強制発現させ、発現が低下した遺伝子を探した。培養細胞で miRNA を強制発現させた理由は、これら 3 つの細胞株は miRNA の発現レベルが低かったためである。これらの細胞は、血清中の EV から miRNA を取り込み、神経機能を維持しているのではないかと考えた。すなわち、神経機能を抑制する遺伝子の発現が、miRNA の取り込みによって低下している可能性を考えた。コントロール細胞に比べて発現が低下している各細胞の標的遺伝子候補を抽出し、その組み立て関係をベン図に示した。アストロサイトは、神経前駆細胞やミクログリアと比較して、最も多くの発現変化を示した。アストロサイトは 2 種類の miRNA、hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の作用に強く関与していることが示唆されているので、アストロサイトを標的遺伝子予測に用いた。これらのダウンレギュレート遺伝子のリストは表 S2 に示した。加えて、発現値とともに特定の発現状態(アップレギュレートまたはダウンレギュレート)を含む遺伝子の包括的リストを参照にした。アストロサイトは、hsa-miR-6813-3p については 215 遺伝子、hsa-miR-2277-3p については 2047 遺伝子を標的としていることがわかった。miRNA 標的遺伝子は、miRNA データベースの TargetScan TM を用いて検索し、in vitro で予測された miRNA 標的遺伝子と比較した。具体的には、これらの miRNA によって影響を受ける遺伝子と TargetScan TM 予測とを重複させた。Hsa-miR-6813-3p 標的遺伝子には、BEND4 および SERPING1 が含まれた。Hsa-miR-2277-3p 標的遺伝子には、STN2、BEND4、HLA-DQB1、KYNU、PCDHA4、PCDHA6、および ZSCAN12 が含まれた(**Figure 3, Figure 4**)

hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の GO 解析とパスウェイエンリッチメント解析

同定された標的候補遺伝子に関与する生物学的プロセスを同定するために GO 解析を行った。hsa-miR-6813-3p は主に細胞外マトリックスの細胞成分(CC)に位置し、骨格系の発達、酵素結合受容体タンパク質シグナル伝達経路、リンパ系前駆細胞の分化などの生物学的プロセス(BP)に関与している。Hsa-miR-2277-3p は主に CC の細胞外マトリックスと軸索に存在し、筋肉組織の発生や細胞成分の形態形成などの BP や、分子機能(MFs) (例えば、無機分子実体膜トランスポーター活性やシグナル伝達受容体レギュレーター活性)に関与している。Wikipathways によるパスウェイ濃縮解析では、hsa-miR-6813-3p の予測標的遺伝子に関連するパスウェイ解析の結果、グリア細胞株由来神経栄養因子/トランスフェクション時のシグナル伝達軸、酸化的損傷、エストロゲン受容体経路、グルココルチコイド受容体経路、ガンマ-アミノ酪酸(GABA) 受容体シグナル伝達が示された(表 4)。hsa-miR-2277-3p の予測標的遺伝子から得られたパスウェイ解析の結果、ドパミン作動性神経新生、サイロキシン(甲状腺ホルモン)産生、酸化ストレス、酸化ストレス応答、トリプト産生、トリプトファン代謝、一酸化窒素-環状グアノシン-リン酸-プロテインキナーゼ G 経路を介した神経保護、メチル化経路など、MD の病態生理における複数のプロセスの関与が確認された。

【考 察】

我々の研究は、EV-miRNA をうつ病の重症度と関連付けた最初の研究の一つである。精神神経疾患では、バイオマーカー源として EV を使用した研究が他にもある。Wei ら¹⁾は、MD 患者の血清エクソソームの miRNA 発現プロファイルを調べ、hsa-miR-139-5p が MD の病態形成に重要であることを同定した。Ran らによる別の研究²⁾では、小児期のトラウマが MD の青年における血清 EV マイクロ RNA の不均衡に与える可能性を示唆している。さらに、MD における miRNA に関するいくつかの先行研究では、死後脳組織³⁾、脳脊髄液⁴⁾、全血⁵⁾、血清⁶⁾、血漿⁷⁾ など、様々な種類のサンプルを用いて様々な miRNA 発現パターンが報告されている。これらの研究は、病態生理学的な条件下で、ニューロンが異なる miRNA を含む EV を放出し、特異的な情報を伝達することを示唆している。EV-miRNA と精神神経疾患を結びつける新たな証拠が出現しているにもかかわらず、再現性が欠けていることが大きな問題である。MD に関連する miRNA に関する総括⁸⁾では、研究間で一貫して発現している miRNA はごくわずかであり、miRNA 発現の食い違いの原因は、抽出方法などの方法論の違いである可能性が示唆された。そこで、体液中の EV であるエクソソームに miRNA が安定に存在することから、EV とエクソソームの抽出が注目されている。エクソソームの分離には、従来から、示差・懸濁密度遠心分離、限外ろ過、サイズ排除、沈殿、イムノアフィニティー分離など、いくつかの方法が採用されてきた⁹⁾。包括的な総説¹⁰⁾でも論じられているように、エクソソームを含む EV の分離に最適な方法についてのコンセンサスはまだ得られていない。つまり高い回収率と特異性が望まれるものの、現在の方法では達成できない可能性があることを示唆している。本研究では、エクソソームと miRNA を含む EV の分離にナノろ過法を採用した。ナノフィルトレーション法は粒子の大きさに応じて捕捉するため、エクソソームを含む多くの細胞外小胞を短時間かつ低コストで捕捉できるという利点がある。しかし、エクソソームとマイクロベシクルのサイズは部分的に重なるため、これらが混ざった状態で次の分析を行わなければならないという欠点がある。

EV やエクソソームは血液脳関門(BBB)を通過することができ、精神障害のバイオマーカーとして機能する可能性がある¹¹⁾。関連するメカニズムはまだ完全には解明されていないが、エクソソームが BBB を通過できるという証拠がある¹²⁾。一つの可能性のあるメカニズムは、エクソソームが BBB に取り込まれ、トランスサイトーシスによって BBB を通過することである。もう一つの可能性は、エクソソームが免疫細胞と相互作用し、免疫細胞が小胞をバリア越しに輸送するように誘導することである。脳細胞から放出された EV は、血液からも抽出することができる。エクソソームは様々な細胞から分泌される小胞で、タンパク質、脂質、核酸など様々な生体分子を含んでいる。これらの小胞は、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしており、中枢神経系疾患のさまざまな潜在的治療法として注目されている。このエクソソームが BBB を通過する能力は、CNS への治療薬送達のための有望なアプローチである。

MD における hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の役割に関しては、主に 2 つの知見があった。しかしながら、これらの miRNA に対する MD の潜在的な影響と、シグナル伝達におけるこれらの変化が抗うつ薬やその他の報告されている薬剤の使用によって影響を受ける可能性は除外できない。しかし、健常者と MD 患者との間でこれらの miRNA の発現レベルに有意な差が観察されたことから、これらの変化は MD の根本的な病態生理を反映している可能性が示唆される。まず、MD における細胞外小胞の miRNA の発現量をマイクロアレイ解析によって比較し、うつ病の重症度に応じて発現量が有意に低

下する 3 種類の miRNA を同定した: hsa-miR-6813-3p, hsa-miR-2277-3p, hsa-let-7f-1-3p であり、それぞれ MD の重症度に応じて有意に発現量が低下した。我々の研究では、MD 患者と健常人を区別するために、これら 3 つの miRNA を健常人のものと比較した。hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の発現は、MD 群では健常対照群よりも有意に低かった。先行研究では、miR-6813-3p が ASD に関与していることが報告されている。先行研究では、miR-2277-3p が結腸がん細胞に関与することも示されている。我々の知る限り、本研究は、MD の重症度の増加とともに hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p の発現レベルが有意に減少することを記述した最初の研究である。次に、試験管内で hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p が関与する標的遺伝子の候補を探索し、GO とパスウェイの濃縮解析を行った。同定された miRNA である hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-227-3p を特定の脳細胞タイプで過剰発現させるといふ我々の決定は、いくつかの重要な観察結果に由来する。まず、うつ病患者の血清 EV では、健常人と比較して、これらの miRNA の顕著な減少が認められた。さらに、実験に用いた細胞では、これら 2 つの miRNA の発現レベルは著しく低かった。これらの所見から、神経細胞は内在性の miRNA 発現量が低いにもかかわらず、血清 EV からこれらの miRNA を獲得し、正常な機能を維持するのに役立っているのではないかという仮説を立てた。われわれの仮説を支えているのは、細胞外小胞、特にエクソソームが血液脳関門を双方向に通過する能力を実証した先行研究である。我々は miRNA の発現が低い培養細胞にこれらの miRNA を導入し、神経機能に作用するポジティブなメカニズムを解明することも目的とした。この過程で、私たちの研究は主に、これらの miRNA によって影響を受ける可能性のある遺伝子を同定することに重点を置いた。これらの miRNA の活性を高めることで、関連する標的遺伝子をより正確に同定することができた。マイクロアレイによる予測標的遺伝子の抽出では、hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p が、アストロサイトにおいて最も大きな発現変化を示した。hsa-miR-6813-3p と hsa-miR-2277-3p はアストロサイトに対して調節作用を示すことから、生体機能の調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、アストロサイトに着目した。試験管内で抽出された予測標的遺伝子を、ターゲットスキャンの標的遺伝子と比較した。hsa-miR-6813-3p の標的遺伝子候補は BEND4 と SERPING1 であり、hsa-miR-2277-3p の標的遺伝子候補は STN2, BEND4, HLA-DQB1, KYNU, PCDHA4, PCDHA6, ZSCAN12 であった。これらの遺伝子はうつ病と関連していた¹³⁾。Metascape による GO 解析で得られた GO プロセスでは、リンパ系前駆細胞の分化に関連する生物学的プロセスが hsa-miR-6813-3p で明らかにされた。これまでの研究で、MD とストレス、免疫系の変調との関連が報告されており、hsa-miR-6813-3p の発現が変化していることが一因である可能性がある。hsa-miR-2277-3p は、興味深いことに、軸索細胞成分を含む脳神経伝達物質と強い関連を示しており、hsa-miR-2277-3p のこれらの機能が MD の病態に関与している可能性がある。

パスウェイ濃縮解析の結果、hsa-miR-6813-3p はグルココルチコイド受容体経路と GABA 受容体シグナル伝達に関与している可能性が示唆された。さらに、hsa-miR-2277-3p は、ドーパミン作動性神経新生とドーパミン作動性神経細胞経路に影響を及ぼす可能性がある。グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸、セロトニン、ノルエピネフリン、ドーパミンを含むいくつかの脳神経伝達系は、MD に関与している¹⁴⁾。我々は、これらのプロセスの障害が MD の重症度に影響を及ぼすかもしれないと想定している。

しかし、我々の研究にはいくつかの研究限界がある。第一に、サンプルサイズが小さく、MD 患者の数が非常に偏っていた。第二に、研究デザインは横断的であった。第三に、参加者への抗うつ薬やベンゾジアゼピンの投与が miRNA 発現レベルに影響を与えた可能性が否定できない。第 4 に、マイクロアレイデータの検証だけでは偽陽性の結果を除外するには不十分である。第 5 に、男女間で miRNA 発現に差が認められたが、年齢、性別、薬剤の種類、投薬量などの共変量を組み込んだ多変量解析を行うことができなかった。以上のことから、これら結果は慎重に解釈される必要がある。要約すると、本研究における MD 重症度分類は HAM-D スコアのみに依存しており、バイオマーカーとして miRNA レベルを群間で比較する方法論的妥当性については、さらに包括的な調査が必要である。今後本研究の予備的な結果を確認するために、よりサンプル数の多いコホート研究、または制限デザインを用いた薬剤未投与の MD 患者を対象とした研究が必要である。

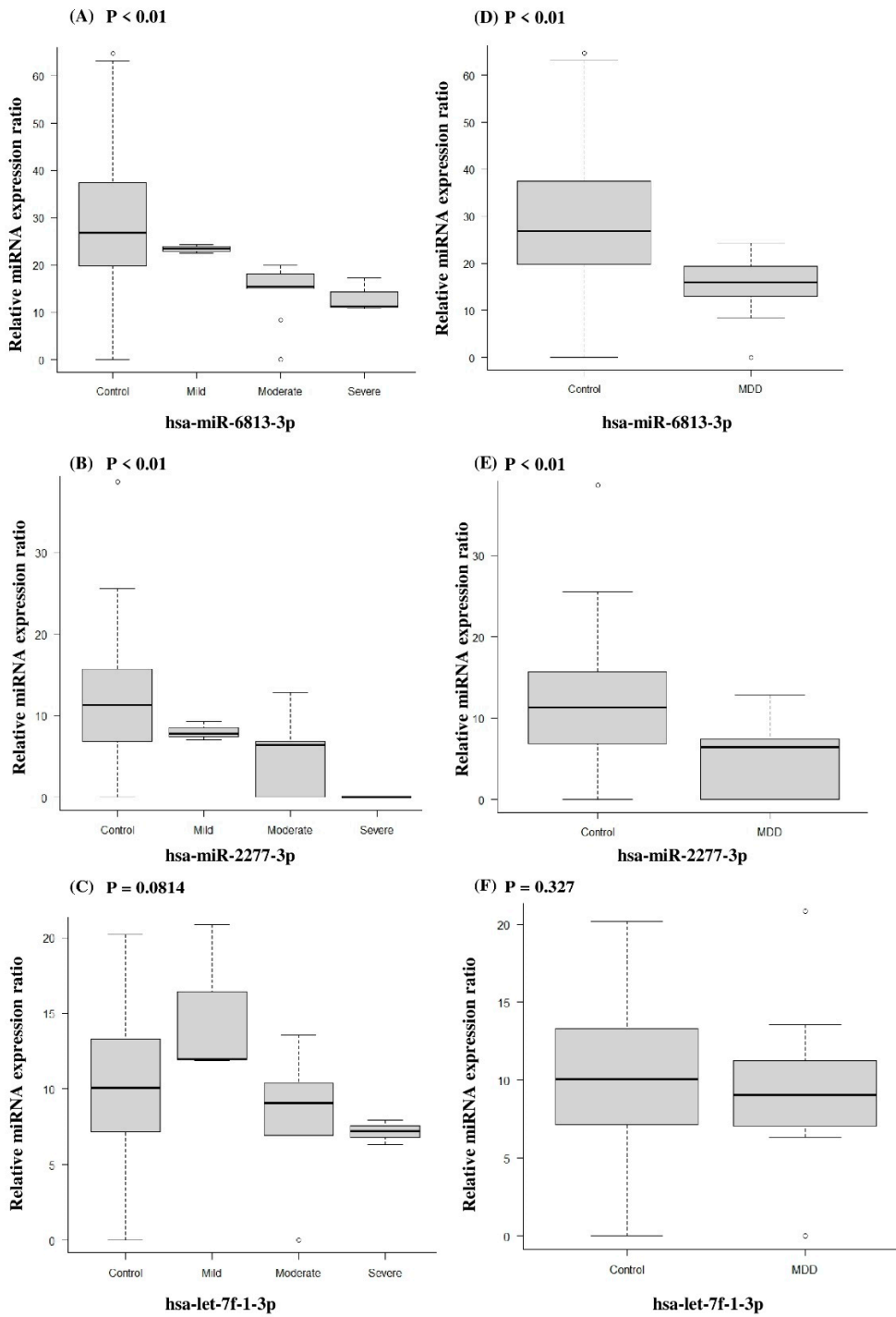
【臨床的意義・臨床への貢献度】

EV 中の hsa-miR-2277-3p および hsa-miR-6813-3p の発現レベルがうつ病の state バイオマーカー候補となる可能性がある。現在 larger second set でこの予備的実験結果を確認作業中である。

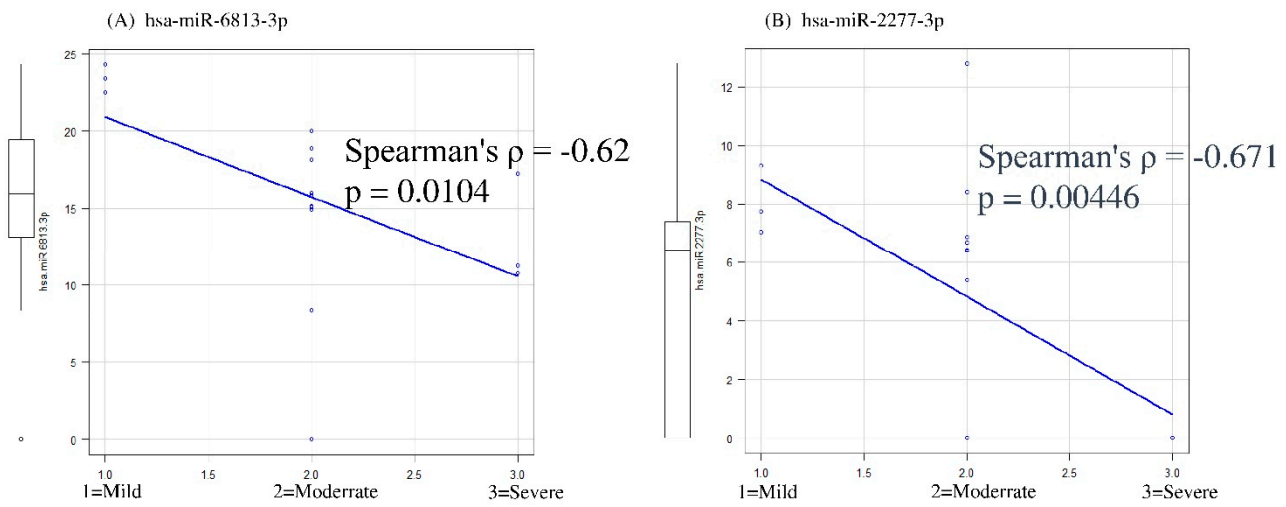
【参考・引用文献】

1. Wei ZX, Xie GJ, Mao X, Zou XP, Liao YJ, Liu QS, Wang H, Cheng Y. Exosomes from patients with major depression cause depressive-like behaviors in mice with involvement of miR-139-5p-regulated neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 2020 May;45(6):1050-1058. doi: 10.1038/s41386-020-0622-2. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31986519; PMCID: PMC7162931.
2. Ran LY, Kong YT, Xiang JJ, Zeng Q, Zhang CY, Shi L, Qiu HT, Liu C, Wu LL, Li YL, Chen JM, Ai M, Wang W, Kuang L. Serum extracellular vesicle microRNA dysregulation and childhood trauma in adolescents with major depressive disorder. *Bosn J Basic Med Sci*. 2022 Oct 23;22(6):959-971. doi: 10.17305/bjbms.2022.7110. PMID: 35659238; PMCID: PMC9589301.
3. Smalheiser, N. R., Lugli, G., Rizavi, H. S., Torvik, V. I., Turecki, G., Dwivedi, Y. (2012). MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLOS ONE*. 7, e33201. Doi: 10.1371/journal.pone.0033201. [Epub 2012 March 9]. PMID: 22427989, PMCID: PMC3302855.
4. Wan, Y., Liu, Y., Wang, X., Wu, J., Liu, K., Zhou, J. et al. (2015). Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLOS ONE*. 10, e0121975. Doi: 10.1371/journal.pone.0121975, PMID: 25763923, PMCID: PMC4357380.
5. Maffioletti, E., Cattaneo, A., Rosso, G., Maina, G., Maj, C., Gennarelli, M. et al. (2016). Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *J. Affect. Disord*. 200, 250–258. Doi: 10.1016/j.jad.2016.04.021. [Epub 2016 April 20]. PMID: 27152760.
6. Gheysarzadeh A, Sadeghifard N., Afraidooni L. Pooyan, F. H. et al. (2018). Serum-based miRNA biomarkers for major depression: MiR-16, miR-135a, and miR-1202. *J. Res. Med. Sci*. 23, 69. Doi: 10.4103/jrms.JRMS_879_17, PMID: 30181751, PMCID: PMC6116664.
7. Enatescu, V. R., Papava, I., Enatescu, I., Antonescu, M., Anghel, A., et al. (2016). Circulating plasma microRNAs in patients with major depressive disorder treated with antidepressants: a pilot study. *Psychiatry Investig*. 13, 549–557. Doi: 10.4306/pi.2016.13.5.549. [Epub 2016 September 30]. PMID: 27757134, PMCID: PMC5067350.
8. Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., et al. (2001). Analysis of antigen-presenting cell-derived exosomes based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 247, 163–174. Doi: 10.1016/s0022-1759(00)00321-5, PMID: 11150547.
9. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750. PMID: 30637094; PMCID: PMC6322352.
10. Nishi, K., Izumi, H., Tomonaga, T., Nagano, C., Morimoto, Y., and Horie, S. (2023). IL-6-Mediated Upregulated miRNAs in Extracellular Vesicles Derived from Lund Human Mesencephalic (LUHMES) Cells: Effects on Astrocytes and Microglia. *Biomolecules* 13. Doi: 10.3390/biom13050718. PMID: 37238588; PMCID: PMC10216158.
11. Saeedi, S., Israel, S., Nagy, C., Turecki, G. (2019). The emerging role of exosomes in mental disorders. *Transl. Psychiatry*. 9, 122. doi: 10.1038/s41398-019-0459-9, PMID: 30923321, PMCID: PMC6438960.
12. Banks, W. A., Sharma, P., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Ludwig, N., Whiteside, T. L. (2020). Transport of extracellular vesicles across the blood-brain barrier: brain pharmacokinetics and effects of inflammation. *Int. J. Mol. Sci*. 21, 4407. doi: 10.3390/ijms21124407, PMID: 32575812, PMCID: PMC7352415.
13. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O. et al. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun*. 10, 1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6, PMID: 30944313, PMCID: PMC6447622.
14. Kalia, M. (2005). Neurobiological basis of depression: An update. *Metabolism*. 54(Suppl 1), 24–27. doi: 10.1016/j.metabol.2005.01.009, PMID: 15877309.

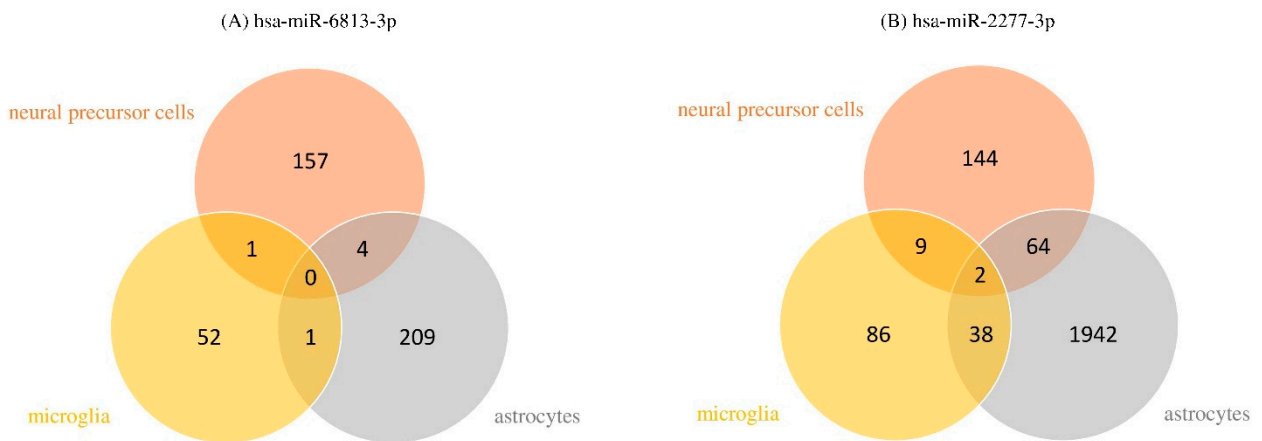
(Figure 1)



(Figure 2)

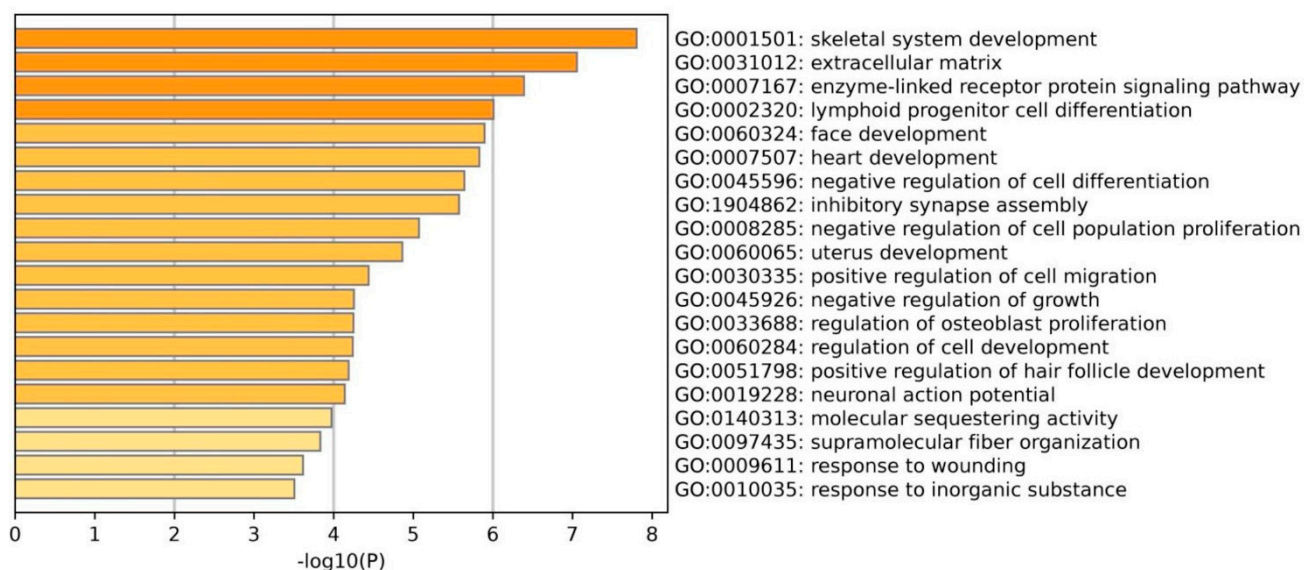


(Figure 3)



(Figure 4)

(A) GO analysis: hsa-miR-6813-3p



(B) GO analysis: hsa-miR-2277-3p

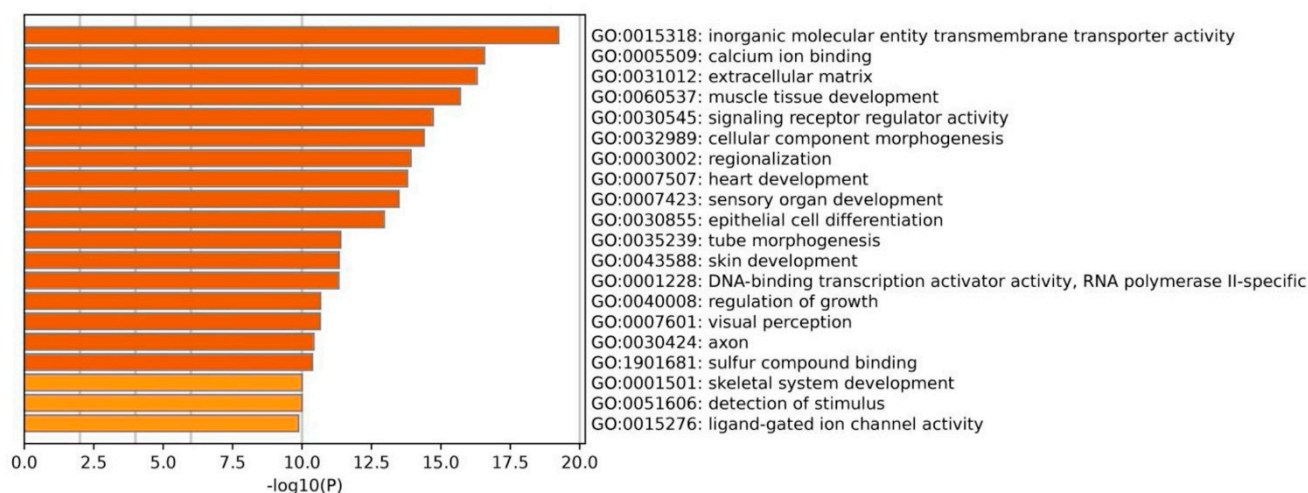


Table 1. Demographic and clinical profile.

Variable	Value
HAMD score	16.50±3.92
Age, (years)	50.13±7.16
Sex	
Female, n (%)	8.0(50.0)
Male, n (%)	8.0(50.0)
Years of education	12.0(1.50)
Ethnicity	
Japanese, n (%)	16(100.0)
Drinking status	
Current drinker, n (%)	7.0(43.75)
Lifetime abstainer, n (%)	9.0(56.25)
Smoking status	
Current smoker, n (%)	2.0(12.50)
Past smoker, n (%)	6.0(37.50)
Never smoker, n (%)	8.0(50.0)
Number of episode	1.0(1.0)
Antidepressant use	
Yes, n (%)	12.0(75.0)
No, n (%)	4.0(25.0)
Benzodiazepine use	
Yes, n (%)	10.0(62.50)
No, n (%)	6.0(37.50)
Care setting	
Inpatient, n (%)	14.0(87.50)
Outpatient, n (%)	2.0(12.50)

Normal distribution data is displayed as mean ± standard deviation.

Non-normally distributed data is displayed as median (quartile deviation).

Categorical variables are displayed as counts (percentages).

(Table S1)

Supplementary Table 1. Differential Expression of miRNAs in MD Cases: Significant Changes in 28 miRNAs.

Factor <i>number</i>	Severity			<i>p</i> .value
	Mild 3	Moderrate 10	Severe 3	
hsa-let-7f-1-3p	11.98	9.082	7.194	3.657e-2*
hsa-miR-1236-5p	16.86	33.27	12.75	2.839 e-2
hsa-miR-1306-5p	7.854	17.70	0	3.647 e-2
hsa-miR-150-5p	14.43	4.636	12.51	4.541 e-2
hsa-miR-191-3p	15.57	6.156	12.71	4.12 e-2
hsa-miR-1910-5p	0	14.12	0	2.945 e-2
hsa-miR-2277-3p	7.750	6.410	0	3.423 e-2*
hsa-miR-2392	26.59	143. 0	37.41	3.267 e-2
hsa-miR-25-5p	17.35	38.36	0	2.575 e-2
hsa-miR-3177-5p	19.31	13.93	19.84	3.298 e-2
hsa-miR-3190-3p	25.86	85.23	27.10	4.307 e-2
hsa-miR-365a-5p	41.97	152.2	29.69	2.82 e-2
hsa-miR-4436b-5p	0	19.46	0	3.813 e-2
hsa-miR-4646-5p	13.57	58.25	0	2.805 e-2
hsa-miR-4681	0	16.32	0	3.347 e-2
hsa-miR-4721	0	52.38	0	3.716 e-2
hsa-miR-4726-3p	0	7.599	0	3.158 e-2
hsa-miR-483-3p	0	6.129	0	3.158 e-2
hsa-miR-483-5p	0	34.88	0	3.991 e-2
hsa-miR-490-3p	16.42	4.515	8.662	4.824 e-2
hsa-miR-516a-5p	17.47	6.039	17.25	3.716 e-2
hsa-miR-6070	18.66	5.945	15.88	4.187 e-2
hsa-miR-642a-5p	0	6.233	0	3.158 e-2
hsa-miR-6780b-3p	0	8.443	0	3.482 e-2
hsa-miR-6813-3p	23.40	15.49	11.23	2.748 e-2*
hsa-miR-6834-3p	0	7.996	0	3.482 e-2
hsa-miR-7113-3p	0	20.92	0	4.631 e-2
hsa-miR-718	18.86	13.29	19.13	6.224 e-3

* $p < 0.05$ and decreasing expression with severity

Values in Table 3 represent miRNA signal values adjusted by subtracting the mean of the Negative Control \pm 2SD.

MiRNAs with non-positive adjusted values are shown as "0". Valid miRNAs have their adjusted signal values displayed.