

## 亜急性硬化性全脳炎におけるバイオマーカーの検討

研究分担者：長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野  
研究協力者：松重武志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野  
研究協力者：市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター小児科  
研究協力者：大賀正一 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野（小児科）  
研究協力者：藏満保宏 山口大学大学院医学系研究科医学専攻  
システムズ再生・病態医化学講座  
研究協力者：Banu Anlar Department of Pediatric Neurology Hacettepe University  
Faculty of Medicine

### 研究要旨

【背景】報告者らはこれまで亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis: SSPE) 患者の髄液を用いて、病勢の把握のためのバイオマーカー検索を行ってきて、いくつかの分子について有意な結果を得られたが、効率、臨床情報の不足および患者検体が希少であることから、まだ臨床現場で使用できるバイオマーカーは見つかっていない。

【方法】本研究期間内には以下の研究を行った。

① Microtubule-associated protein 2 (MAP2) はニューロン、特に樹状突起に多く発現している細胞骨格蛋白で、ニューロンの分化、成長、可塑性、変性との関連が報告されている。血清および髄液中 SSPE 患者の髄液中 MAP2 濃度について検討した。

② トリプトファン代謝の主要経路であるキヌレニン経路は indoleamin 2, 3-dioxygenase (IDO) が律速段階酵素となり、免疫抑制や神経毒性に関与することが報告されている。SSPE 患者の血清および髄液を用いてキヌレニン経路の活性化および代謝産物であるキノリン酸の濃度を検討した。

③ プロテオミクスの観点から SSPE 髄液蛋白の網羅的な解析について検討した。

【結果および考察】 SSPE 患者において髄液中 MAP2 濃度およびキノリン酸濃度が有意に高値で、病勢把握、治療効果判定の指標としてのバイオマーカーになる可能性が示唆された。またプロテーム解析でも髄液中 Dermcidin が有意に上昇している可能性があるため今後検討していく。

### A. 研究目的

亜急性硬化性全脳炎 (Subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) の病態は未だ不明で、病勢を把握するためのバイオマーカーもなく、根治療法もない。本研究では、トルコ共和国および国内研究協力者から提供された患者検体を用いた解析から、SSPE における病態の解明と病勢を把握するバイオマーカーについて検討し、「診断基準・重症度分類の策定・改訂」を目的とする。

Microtubule-associated protein 2 (MAP2) はニューロン、特に樹状突起に多く発現している細胞骨格蛋白で、ニューロンの分化、成長、可塑性

および変性との関連が指摘されている。また虚血動物モデルを用いた免疫組織化学的研究では、病変部位での MAP2 の減少が報告されている<sup>1)</sup>。さらに虚血後数時間以内に血清中 MAP2 濃度上昇が認められ、神経傷害の早期バイオマーカーとなる可能性も報告されている<sup>2)</sup>。報告者らは SSPE 患者の髄液中 MAP2 濃度について検討した。

トリプトファン代謝の主要経路であるキヌレニン経路は indoleamin 2, 3-dioxygenase (IDO) が律速段階酵素となり、免疫抑制や神経毒性に関与することが報告されている。本研究では SSPE 患者の血清および髄液を用いてキヌレニ

ン経路の活性化および代謝産物であるキノリン酸濃度を検討した。

髄液中 MAP2 濃度およびキノリン酸濃度を含め、病勢の把握、病態解明および治療効果判定のためのバイオマーカーとして検索を行ってきたが、効率、臨床情報の不足および患者検体が希少であることから、十分な結果が得られていない。そのためプロテオミクスの観点から SSPE 髄液蛋白の網羅的な解析についても検討する。

## B. 研究方法

トルコ Hacettepe 大学および本邦の研究協力者から提供された SSPE 患者血清および髄液を  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。これらの検体を用いて下記の研究を行った。

### ①血清および髄液中 MAP2 濃度

血清は SSPE 群 14 例、対照群 13 例（発達遅滞、てんかんなど）、髄液検体は SSPE 群 15 例、対照群 13 例を用いた。MAP2 濃度を ELISA 法（Usn Human Microtubule Associated Protein 2 ELISA Kit）で測定した。

また治療開始前から治療後半年まで経時的に 9 点の髄液検体がある本邦 SSPE 症例（19 歳発症）についても髄液中 MAP2 濃度を測定し、neurological disability index (NDI) score との関係について検討した。

### ②血清キヌレニン/トリプトファン比および髄液中キノリン酸濃度

SSPE 患者の診断時血清 20 検体（年齢 3.5～11.0 歳、中央値 11.0 歳、男 17 名、女 3 名）および髄液 25 検体（年齢 5.0～15.0 歳、中央値 11.0 歳、男 18 名、女 7 名）、対照群として血清 20 検体（年齢 7.2～15.8 歳、中央値 8.5 歳、男 15 名、女 5 名）、髄液 20 検体（年齢 1.9～15.8 歳、中央値 8.4 歳、男 9 名、女 11 名）を対象として、血清キヌレニン/トリプトファン比（KYN/Trp 比）および髄液キノリン酸濃度について検討した。またこのうち 1 症例（19 歳男性）における髄液キノリン酸の経時変化と NDI score との関係についても検討した。

### ③髄液プロテオーム解析

SSPE 患者 1 例および疾患対照として睡眠障害患者 1 例の診断時髄液を用いた。蛋白濃縮後、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動を行い、対照と異なるスポットの等電点と分子量を求め、質量分析により解析した。

## （倫理面への配慮）

本研究では研究協力者の Hacettepe 大学 Banu Anlar 教授から個人が特定できないような状態で、匿名化した検体の提供を受けている。

本研究はヒト由来の検体を使用するため山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認を得て本研究を遂行している。

## C. 研究結果

### ①血清および髄液中 MAP2 濃度

髄液中 MAP2 濃度は SSPE 群で中央値 307.8 pg/ml (84.0 - 1, 434.4 pg/ml) で、対照群で中央値 69.0 pg/ml (9.4 - 1, 046.4 pg/ml) に比して、有意な上昇を認めた ( $p=0.009$ ) (図 1)。一方、血清中 MAP2 濃度は SSPE 群（中央値 11,577.6 pg/ml、7,403.2 - 1,164,011.7 pg/ml）と対照群（中央値 9,654.7 pg/ml、2,061.1 - 20,004.8 pg/ml）に有意差を認めなかった。

また病型別比較では緩徐進行型で髄液中 MAP2 濃度が、急速進行型に比して高値である傾向を認めた（統計学的有意差なし）(図 2)。

さらに図 3 に示す如く、経時的に測定した SSPE 症例では髄液中 MAP2 濃度の推移は、治療開始前が 1,371 pg/ml で最高値だった。IFN- $\beta$  および Ribavirin の治療開始後に 390 pg/ml へ低下し、3 か月間 NDI score の進行は認めなかった。その後 4 か月と 6 か月に NDI スコアの増悪を認め末期に至ったが、髄液中 MAP2 濃度は NDI スコアが増悪する直前にそれぞれ 1,052 pg/ml、675 pg/ml に上昇した。

### ②髄液中キノリン酸濃度

血清 KYN/Trp 比は SSPE 群 (0.026～0.081、中央値 0.042) と対照群 (0.020～0.096、中央値 0.045) の間には有意差を認めなかった ( $p=0.88$ ) (図 4)。髄液中キノリン酸濃度は SSPE 群 (11.4～285.5nM、中央値 24.3nM) では、対照群 (3.7～44.6nM、中央値 12.1nM) に比して有意

に高値であった ( $p < 0.001$ ) (図 5)。また経時的に測定できた SSPE 症例の髄液中キノリン酸濃度は NDI score ( $r = 0.72$ ,  $p = 0.030$ ) および病日 ( $r = 0.85$ ,  $p = 0.0033$ ) と有意な正の相関を示した (図 6)。

### ③ 髄液プロテオーム解析

SSPE と疾患対照で計 472 のスポットが検出された (図 7)。このうち SSPE が対照より 3 倍以上高く、視認できる明瞭なスポットは 11 個検出された。11 個のスポットは等電点 10 付近で分子量 ①約 160kDa、②約 150 kDa、③約 130 kDa、④約 100 kDa、⑤約 90 kDa、⑥約 50 kDa、⑦約 45 kDa、⑧約 10 kDa、等電点 7.6 付近で分子量⑨約 10kDa、等電点 6.8 付近で分子量⑩約 10kDa、等電点 6.5 付近で分子量⑪約 10kDa であった (表 1)。このうち質量分析により⑪が Dermcidin であると推測された。

## D. 考察

SSPE 患者における髄液中 MAP2 濃度の上昇は、樹状突起の変性・脱落を間接的に示唆するものと考えられる。また治療開始後の髄液中 MAP2 濃度の低下は、治療効果により病勢が落ち着いていることを意味すると考えた。さらに髄液中 MAP2 濃度の上昇はその後の神経学的な進行と関連している傾向がみられ、髄液中 MAP2 濃度の推移をみることは SSPE の病勢把握、治療効果判定の指標として有用である可能性が示唆された。今後症例を集積し、その有用性について検討していきたい。また、現在その他の関連蛋白についても検討中である。

病期の進行に伴って髄液中キノリン酸の増加が認められ、SSPE の病態に関与している可能性が示唆された。代謝産物であるキノリン酸の増加はキヌレン経路の活性化を示唆する。キヌレン経路の活性化は、妊娠時の免疫寛容<sup>3)</sup> やがん細胞の免疫抑制能獲得<sup>4)</sup> に関与するとされ、SSPE における変異型麻疹ウイルスの持続感染に関与している可能性もあるため興味深いと考える。さらにキノリン酸は NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストとして興奮性神経毒性をもつ<sup>5)</sup> ため、SSPE における神経症状との関係が示唆された。

過去の SSPE 患者における髄液プロテオーム

解析の報告は 1 つのみで、4 から 5 のスポットが認められたが、同定には至っていない<sup>6)</sup>。

Dermcidin はエクリン汗腺から分泌される anti-microbial peptide として報告された [7]。C 末端が抗菌および抗真菌作用を有し、皮膚の感染防御機構を担っている。N 末端は diffusible survival evasion peptide として酸化ストレス下での神経細胞生存に関わる。本研究では SSPE 患者の髄液では疾患対照に比して Dermcidin の有意な上昇が考えられたが、今回検体数が SSPE および疾患対照とも各 1 例であったため、今後 SSPE の病態における Dermcidin の関与について検体数を増やし、Western blot で確認していく。さらに複数症例で再度二次元電気泳動および質量分析を行い、有意差のあるものを選別して検討する。Dermcidin を含め有意な蛋白について、ELISA で複数症例および同一症例の病期別測定を行い、臨床的意義について検討する。

## E. 結論

SSPE 患者において髄液中 MAP2 濃度およびキノリン酸濃度は病勢把握、治療効果判定の指標としてのバイオマーカーになる可能性が示唆された。また髄液中 Dermcidin についても可能性があるため今後検討していく。

### [参考文献]

- 1) Ballough GP, Martin LJ, Cann FJ, Graham JS, Smith CD, Kling CE, Forster JS, Phann S, Filbert MG. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. *J Neurosci Methods* 61: 23-32, 1995.
- 2) Park D, Joo SS, Lee HJ, Choi KC, Kim SU, Kim YB. Microtubule-associated protein 2, an early blood marker of ischemic brain injury. *J Neurosci Res* 90: 461-467, 2012.
- 3) Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193, 1998.
- 4) Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by

indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Nat Med* 9:1269-1274, 2003.

5) Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Mangano RM. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219:316-318, 1983.

6) Dams E. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of serum and cerebrospinal fluid proteins in multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neurol Belg* 86: 233-242, 1986.

7) Schitteck B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun* 4:349-360, 2012.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

2) Hasegawa S. Serum and CSF levels of MAP2 in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) patients. European Paediatric Neurology Society Research Meeting, Bucharest (Romania), September 12-13, 2014.

3) 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 岡 桃子, 百中 宏, 長谷川俊史, 大賀正一. 亜急性硬化性全脳炎における髄液および血清中MAP2濃度の検討. 第56回日本小児神経学会, 浜松, 5.29-31, 2014.

4) 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 岡 桃子, 長谷川俊史, 大森啓充, 奥野海良人, 滝川 修, 大賀正一. 亜急性硬化性全脳炎におけるキヌレニン経路活性化の検討. 第57回日本小児神経学会, 大阪, 5.28-30, 2015.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

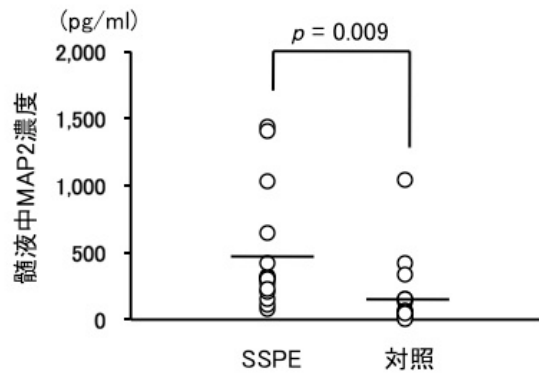


図1 SSPE患者における髄液中MAP2濃度

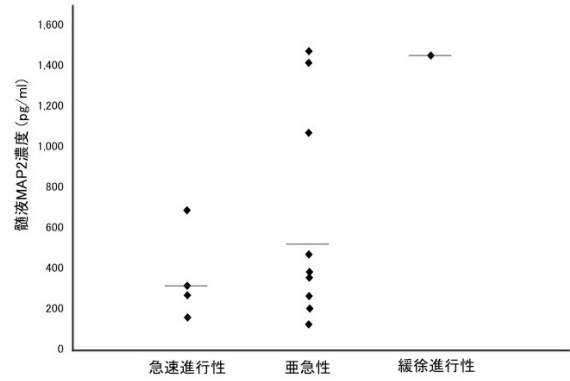


図2 SSPE病型別におけるMAP2濃度

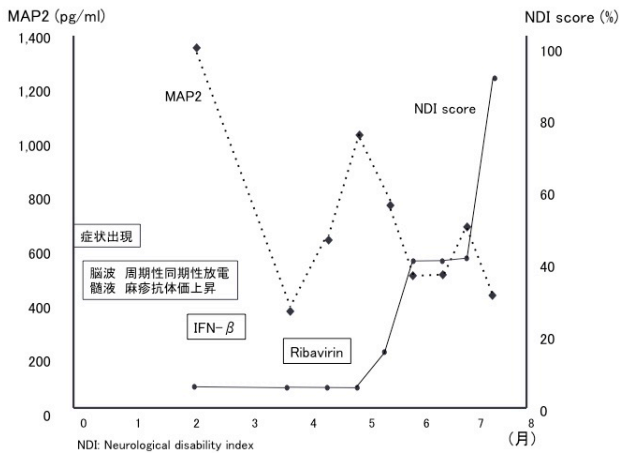


図3 SSPE患者における髄液中MAP2濃度と神経症状の推移

【図の説明】

図1 SSPE患者における髄液中MAP2濃度は対照群に比して有意に高値であった。

図2 SSPE病型別では慢性進行型で髄液中MAP2濃度が、急速進行型に比して高値である傾向を認めた。

図3 経時的に髄液中MAP2濃度を測定したSSPE症例では治療開始前が最高値で、治療開始後に低下し、3か月間NDI scoreの進行は認めなかった。その後4か月と6か月にNDIスコアの増悪を認め末期に至ったが、髄液中MAP2濃度は症状増悪の直前に上昇した。

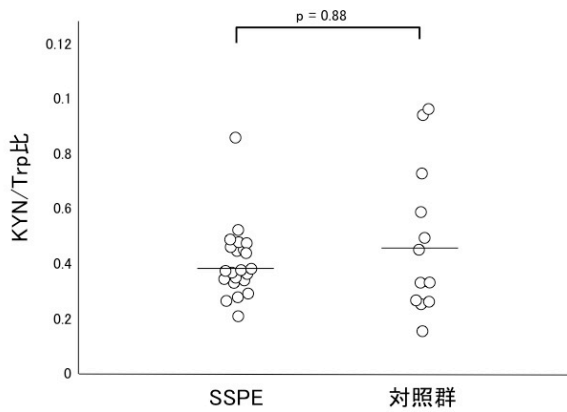


図 4 血清中 KYN/Trp 比の検討

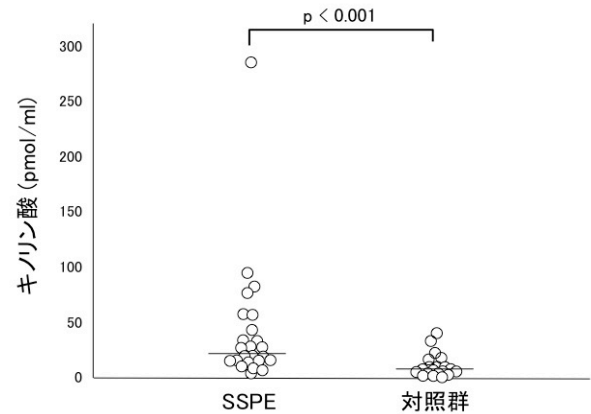


図 5 髄液中キノリン酸濃度の検討

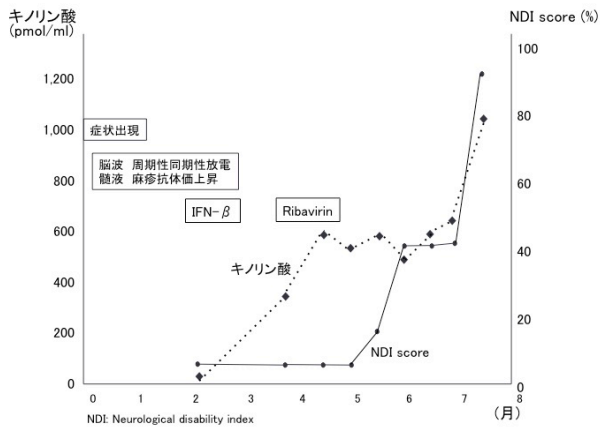


図 6 SSPE 患者 (19 歳男性) における臨床症状の経過と髄液中キノリン酸濃度の推移

【図の説明】

図 4 SSPE 患者における血清中 KYN/Trp 比は対照群と有意差を認めなかった。

図 5 SSPE 患者における髄液中キノリン酸濃度は対照群に比し、有意に高値であった。

図 6 経時的に髄液中キノリン酸濃度を測定した SSPE 症例では治療開始前が最低値で、治療開始後に緩やかに上昇した。その後しばらく横ばいであったが、髄液中キノリン酸濃度は症状増悪の直前に上昇した。

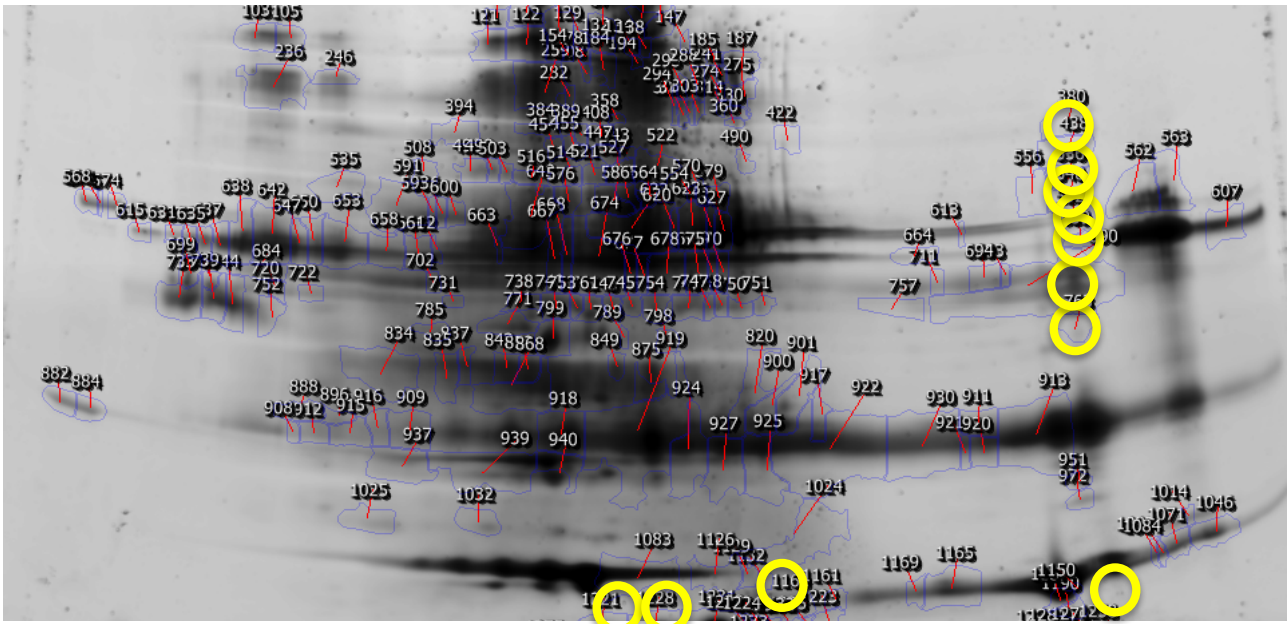


図 7 二次元電気泳動

SSPE 髄液では対照より 3 倍以上高く、視認できる明瞭なスポットが 11 個検出された。

表 1 質量分析

スポット No	等電点	分子量	質量分析による候補蛋白
1	10 付近	約 160 kDa	Keratin
2	10 付近	約 150 kDa	Keratin
3	10 付近	約 130 kDa	Keratin
4	10 付近	約 100 kDa	Keratin Nuclear receptor corepressor 1 (合致ペプチド数 2、分子量 271 kDa) Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
5	10 付近	約 90 kDa	Keratin
6	10 付近	約 50 kDa	Keratin Ig gamma-1、3 chain C (合致ペプチド数 4、2、分子量 36、42 kDa)
7	10 付近	約 45 kDa	Keratin
8	10 付近	約 10 kDa	Keratin Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
9	7.6 付近	約 10 kDa	Keratin Glutamate receptor 1-4 (合致ペプチド数 1、分子量 99-102 kDa)
10	6.8 付近	約 10 kDa	Keratin Glial fibrillary acidic protein (合致ペプチド数 1、分子量 499 kDa)
11	6.5 付近	約 10 kDa	Keratin Dermeidin (合致ペプチド数 3、分子量 11 kDa)