

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

平成 30 年度分担研究報告書

急性脳症の多施設レジストリ・レポジトリ研究体制の拡充に向けた研究
- microRNAに着目した早期診断バイオマーカー探索研究の試みにむけて -

研究分担者 星野 愛 東京大学大学院医学系研究科 発達医科学 助教

研究要旨

希少難病である急性脳症の早期診断バイオマーカーの同定を目指して、多施設患者レジストリ・試料レポジトリ研究体制の整備・拡充を試みた。症候群分類に基づいた急性脳症群および熱性けいれん重積・良性けいれん群の急性期血清・髄液を集積し、病初期に両群を区別する高感度で簡便な早期診断バイオマーカーの同定を最終目標に、複数の医療機関と東京大学、東京都医学総合研究所の相互の協力体制を構築した。今後も症例・試料集積を継続し、症候群毎に早期診断を可能にする特異的 miRNA の探索を推進したい。

A . 研究目的

急性脳症は小児に感染を契機に突然発症し、けいれんや遷延性の意識障害、脳浮腫を伴う難病である。国内の発症者数は年間で数百人と希少であるが、しばしば死亡や後遺症を認め、患者・家族の身体精神的な負担、我が国における社会経済的負担も大きい。

「小児急性脳症診療ガイドライン 2016」が作成され、症候群分類毎に推奨される治療が体系化されたが、病初期(第1病日)は比較的良性の熱性けいれん重積(prolonged FS:p-FS)との鑑別が困難なため脳症治療の介入のタイミングが難しい。臨床現場では急性脳症と p-FS を区別する高感度で簡便

な早期診断バイオマーカーが求められている。現在まで早期診断に有用なバイオマーカーとして血清・髄液の炎症性サイトカイン(IL-6 等)、髄液 tau 蛋白、血清・髄液 S-100、尿中 β_2 -ミクログロブリンなどが報告されているが、全国規模で症候群毎に体系的な検討はされていない。

microRNA (miRNA) は蛋白質をコードしない non-coding (ncRNA) のひとつで、標的メッセンジャーRNA (mRNA) に結合し、mRNA の安定性や翻訳を抑制し遺伝子発現・制御に関与する分子である。近年、miRNA は脳損傷の病態や脳梗塞の急性期バイオマーカー候補として着目されている。p-FS 群と比べ有意に急性脳症群(症候群毎)で病初期

(第1病日)の血清・髄液に高発現を示すmiRNAが同定されれば、治療介入を発症時に判断するバイオマーカーとして臨床応用できる可能性がある。

希少難病である急性脳症(さらに小集団となる個々の症候群)に対し早期診断バイオマーカー探索を効率的に推進するには、可能な限り多くの医療機関より症例・試料を集約し、また解析においては共同研究施設・研究者が相互に研究技術を提供し合い臨床研究を推進する体制が必要である。

研究分担者が所属する東京大学大学院医学系研究科 発達医科学は2010年より日本小児神経学会や厚生労働科学研究費(難治性疾患克服研究)の援助を得て、日本全国の医療機関から症候群別に急性脳症の患者情報と患者末梢血由来のゲノムDNAを集積し疾患感受性遺伝子の探索(「急性脳症の包括的遺伝子解析」)を進める体制がある。現在まで年間約40~50症例(全体で約500症例)の登録がある。本研究ではその体制を生かして、miRNAに着目した早期診断を可能にするバイオマーカーの同定を最終目標に、多施設レジストリ・レポジトリ研究体制を整備・拡充することが目的である。

B. 研究方法

1) 急性脳症のレジストリ・サンプルレポジトリの整備・拡充

2010年より当施設では全国の医療機関から症候群分類として確立しているけいれん重積型脳症[AESD]、急性壊死性脳症[ANE]、脳梁膨大部脳症[MERS]、難治頻回部分発作重積型急性脳炎[AERRPS]、分類不能型脳症[OTHERS]の患者臨床情報と全血(末梢血由来DNA)を集積している。

今年度の患者レジストリ体制としては、研究対照群として熱性けいれん重積[p-FS]や胃腸炎関連けいれん[CwG]などの良性けいれん症例についても広く集積した。症候群別に適した詳細臨床病歴(具体的には、けいれん発作型・持続時間、血液・髄液検査データ、急性期血清・髄液の施設保管状況、脳波・画像所見、治療、予後:PCPCスコア等)の集積を試みた。また試料レポジトリ体制としては、患者全血(末梢血由来DNA)だけではなく、急性期(第1~2病日)および亜急性期(第5病日以降)の血清・髄液を収集した。また先行感染の病原体スクリーニングとして胃腸炎関連の発症については便検体の集積を試みた。

2) microRNAに着目した早期診断バイオマーカー探索へむけた研究体制構築

東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野 こどもの脳プロジェクト(研究分担者:佐久間 啓 先生)より技術提供をうけ、2施設の共同研究体制でmiRNAに着目した早期診断バイオマーカー探索研究を開始した。

方法は急性脳症群および対照群の急性期血清・髄液(200µl)を用いてmiRNA Isolation KitでRNAを抽出。逆転写反応させcDNA化し、(脳梗塞などの疾患関連が指摘されている、またはミクログリア関連の中枢性炎症など脳症病態に関連し得る)候補miRNAについてPCR定量解析し、候補miRNAについて2群間で発現比較し、急性脳症群に高発現する特異的miRNAの同定へ向けて研究体制を整えた。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理審査

を受け承認されている（承認番号 G3504-（17））。レポジトリ試料を用いた共同研究は東京都医学総合研究所の倫理審査も承認されている。個人情報、匿名化を行い、第三者による個人の特定ができないように配慮した。患者または保護者に対し、当該の検査の目的、不利益、危険性について主治医より十分説明を行い、文書による同意を得られた場合にのみ研究を進めた。

C. 研究結果

1) 急性脳症のレジストリ・サンプルレポジトリ

研究倫理申請後に研究協力施設である東大病院小児科、成育医療研究センター神経内科、帝京大学小児科、埼玉市民医療センター小児科などを中心に急性期血清・髄液検体を集積した。2019年3月時点で急性脳症群の血清15症例（AESD 8例、MERS 1例、分類不能型 6例）、髄液10例（AESD 5例、MERS 1例、分類不能型 4例）、対照群の血清11症例（p-FS 10例、CwG 1例）、髄液6例（p-FS 6例）が詳細病歴と共に収集された。次年度も集積を継続し、microRNAに着目した早期バイオマーカー探索に向けて症例数を増やしていく予定である。

2) microRNAに着目した早期バイオマーカー解析

今年度は東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野 こどもの脳プロジェクトで進められている小児炎症性神経疾患の症例レジストリ・試料レポジトリよりサンプルを共有し、また技術提供をうけ、第一段階として急性脳症群 [AERRPS] および対照群 [てんかん症例: Epi] の血清より ce

ll-free RNAおよびcDNAを抽出し、候補miRNAのqPCRによる発現解析の実験条件を検討した。また、解析対象とする候補miRNAを検討した。

候補miRNA	機能的な関連
① miR-15a	・正常血清で比較的安定して発現
② SNORD61	・標準コントロールで使用される
③ miR-155_2 (miR-155-5p)	・炎症性経路に関与 (pro-inflammatory) ・ミクログリア関連のCNS炎症に関与 ・mTLE小児例の海馬で高発現、 ・脳性マラリアの動物モデルでBBBの透過性やサイトカイン発現に関連
④ miR-146a_1 (miR-146a-5p)	・炎症性経路に関与 (pro-inflammatory) ・ミクログリア関連のCNS炎症に関与 ・mTLEで急性期血清に低発現、潜在期に高発現
⑤ miR-124	・炎症性経路に関与 (pro-inflammatory)
⑥ miR-223_1 (miR-223-3p)	・炎症性経路に関与 (pro-inflammatory) ・虚血性脳梗塞(急性期血清 <72hr)で高発現
⑦ miR-15b_2 (miR-15b-5p)	・正常血清で常に発現
⑧ miR-146b_1 (miR-146b-5p)	・虚血性脳梗塞(急性期血清)で高発現
⑨ miR-125a-5p	・虚血性脳梗塞(急性期血清)で高発現
⑩ miR-125b-5p	・虚血性脳梗塞(急性期血清)で高発現
⑪ miR-143-3p	・虚血性脳梗塞(急性期血清)で高発現
⑫ miR-103a-3p	・正常血清で常に発現
⑬ miR-21_1	・IL1R/TLR proinflammation pathway ・Epi+gangliogliomaのアストロサイトで高発現 ・アレルギー性喘息のバイオマーカー

【表1】解析を検討している候補miRNA

D. 考察

今年度は急性脳症のレジストリ・サンプルレポジトリの整備・拡充を進めた。患者集積は当施設が約10年進めている「急性脳症の包括的遺伝子解析」の体制を生かし、急性脳症の重症例の診療の経験が豊富で、診療体制が整っている大学病院や小児専門病院を中心に現場スタッフと集積手順や体制を相互に意見交換する機会を持ち、冬期(12月~2月)の受診数が多い時期に効率よく集積ができるよう体制を構築した。また対照群 [p-FS, CwG] については一次救急診療を行っている医療機関に協力を得て進めた。対照群は数日で退院する症例が多く、患者・家族の説明・同意を得るための十分な時間確保が難しい症例もあり、集積には限界があった。今後、継続的に行う詳細病歴の蓄積は

早期診断および重症化予測のバイオマーカー探索において重要な臨床情報基盤となると考える。

microRNAに着目した早期バイオマーカー解析は、他の研究機関とサンプルおよび技術的な協力体制を構築することができた。次年度は急性脳症群として AERRPS だけではなく AESD や ANE、MERS などの症候群についても急性期の患者血清について cell-free RNA および cDNA を抽出し、急性脳症と対照群、また症候群間でも高発現する特異的 miRNA が関与していないか候補 miRNA について解析を進める予定である。臨床病型に応じた早期診断・重症化を予測するバイオマーカーが同定できれば、発症時に迅速な治療選択を可能にし、重症化が予想される症例については集中管理体制や早期リハビリ導入による予後の軽減を図れる可能性があると考ええる。

E . 結論

希少難病である急性脳症の早期診断バイオマーカー探索を効率的に推進するために、当施設と複数の医療機関による共同体制で症例レジストリ・試料レポジトリの体制を整備・拡充した。miRNA 解析は当施設と共同研究機関・研究者が連携して試料サンプルや研究技術を共有し、早期診断バイオマ-

ーカー探索が前進する研究体制を構築した。今後も急性脳症の患者・サンプル集積を行い、病初期に熱性けいれん重積と区別する有用な早期診断バイオマーカーの同定にむけて本研究を推進していきたい。

F . 研究発表

1. 論文発表

Acute necrotizing encephalopathy and a carnitine palmitoyltransferase 2 variant in an adult. Kobayashi Y, Kanazawa H, Hoshino A, Takamatsu R, Watanabe R, Hoshi K, Ishii W, Yahikozawa H, Mizuguchi M, Sato S. J Clin Neurosci. 2019 Mar;61:264-266. doi: 10.1016/j.jocn.

2. 学会発表

1) 星野愛, 齋藤真木子, 久保田雅也, 高梨潤一, 岡明, 水口雅. 急性壊死性脳症における遺伝的リスクファクター. 第 121 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2018/04/20-22.

2) 星野愛, 倉橋宏和. 急性脳症の最新知見 急性脳症の遺伝的素因. 第 60 回日本小児神経学術集会 シンポジウム, 東京, 2018/05/31-06/02.

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

