

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
令和元年度分担研究報告書

microRNAに着目した脳炎脳症の早期診断バイオマーカー探索に関する研究
- 急性脳炎脳症の多施設レポジトリ体制を生かして -

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

近年、血液中の cell-free miRNA は様々な疾患の低侵襲的診断バイオマーカーとして着目されている。本研究では本研究班で構築された急性脳炎・脳症の多施設レポジトリ体制を生かして小児急性脳炎脳症の一症候群である難治頻回部分発作重積型急性脳炎（AERRPS）を対象に、血清 miRNA に着目した診断バイオマーカー探索を行った。IL1R/TLR シグナル経路関連または虚血性脳梗塞の診断バイオマーカーとして報告のある 8 つの miRNA について qPCR 解析を行い、比較 Ct 法で 3 つのリファレンス遺伝子を用いて両群間の各 miRNA 発現を比較した。今回の検討では脳梗塞の急性期バイオマーカーとして報告のある血清 miR-125a が AERRPS 群において有意に高発現を示した。（ $p=0.028$ ）。今後は Inflammatory Pathway miRNA array 等を用いて解析ターゲット数を増やした検討を進め、将来的には AESD をはじめとした他の症候群においても miRNA 発現解析を推進し、急性脳炎・脳症の症候群毎の診断バイオマーカーの探究へ発展させたい。

A . 研究目的

急性脳症は国内発症数が年間で数百人と希少であるが、発症者の約 5 人が死亡に至る難病である。早期の診断・治療介入が望ましいが、発症時の臨床症状や検査所見では熱性けいれんなどのけいれん性疾患との鑑別が困難なことが多く、確定診断に数日の時間を要する場合が多い。臨床現場では急性脳症と良性の経過をたどるけいれん性

疾患を早期に区別する高感度で簡便な診断バイオマーカーが求められている。

現在までに熱性けいれんと区別する有用な早期診断バイオマーカーとしては、血清・髄液の IL-6、tau 蛋白、S-100、visinin-like protein 1 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。特に血清 miRNA は低侵襲的であることから脳梗塞などの急性期の診断・予後予測マーカーとして着目されている。miRNA 解析における最低必要量は血清 200 μ l と少量であることから小児の急性脳症脳炎においても臨床応用が期待できる。

本研究では希少難病のサンプリングを加速化するために、2つの急性脳炎・脳症の多施設レポジトリ体制(東京大学 発達医科学, 都医学研こども脳プロジェクト)を生かして血清試料を集積し、血清 miRNA に着目した急性脳炎脳症の低侵襲的診断バイオマーカーを探索することが目的である。

第一段階として、集積された難治頻回部分発作重積型急性脳炎(AERRPS)を対象に、病期において鑑別となる難治てんかんと区別するバイオマーカー探索を目的として両群の血清 miRNA 発現を比較検討した。

B . 研究方法

AERRPS10例(年齢1歳-11歳7ヶ月、男児8例、女児2例)、比較対照群は難治てんかん10例。患者血清より miRNeasy Serum/Plasma kit, QIAGEN を用いて RNA を抽出。逆転写反応で得られた cDNA を用いて、IL1R/TLR シグナル経路に関連または虚血性脳梗塞の診断バイオマーカーとして報告のある miRNA (miR-146a, -146b, -155, -233, -125a, -125b, -143, -21) を選択し、Real-time PCR で定量解析を行った。解析データは比較 Ct 法で3つのリファレンス miRNA (Ce-miR-39_1, miR-15b, SNORD61) を用い

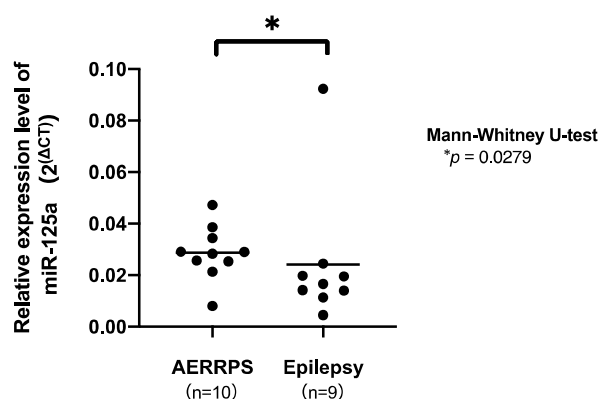
て両群間の各 miRNA 発現を比較した。

(倫理面への配慮)

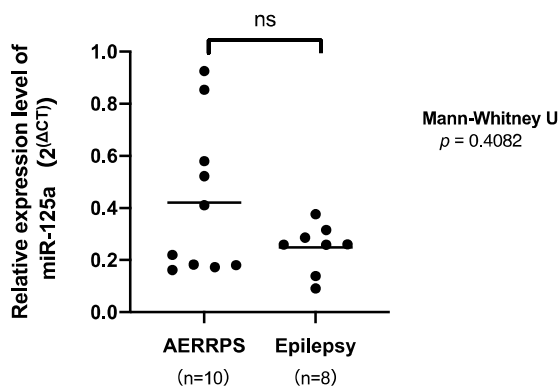
本研究は東京大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理審査を受け承認されている(承認番号 G3504-(17))。レポジトリ試料を用いた共同研究は東京都医学総合研究所の倫理審査も承認されている。個人情報、匿名化を行い、第三者による個人の特定ができないように配慮した。患者または保護者に対し、当該の検査の目的、不利益、危険性について主治医より十分説明を行い、文書による同意を得られた場合にのみ研究を進めた。

C . 研究結果

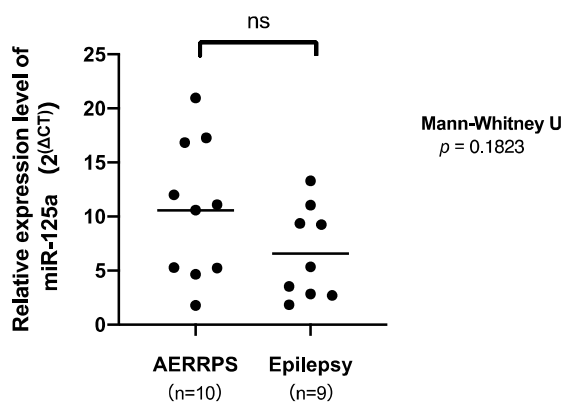
Ce-miR-39_1の補正によるmiR-125aはAERRPS群で有意に上昇していた($p=0.028$)【図1】。miR-15b, SNORD61の補正による解析においてもmiR-125aが疾患群で高発現の傾向がみられた【図2、3】。miR-125a以外の7つのmiRNA解析では2群間で有意な差は認めなかった。



【図1】AERRPS群、難治てんかん群におけるmiR-125a発現比較 (* リファレンス遺伝子として Ce-miR-39_1を使用)



【図2】AERRPS群、難治てんかん群におけるmiR-125a発現比較
 (* リファレンス遺伝子として miR-15b_2 を使用)



【図3】AERRPS群、難治てんかん群におけるmiR-125a発現比較
 (* リファレンス遺伝子として SNORD61 を使用)

D. 考察

小児急性脳炎脳症の一症候群であるAERRPSにおいて難治てんかんと鑑別する特異的な血清miRNAの探索を目的として8つのターゲットmiRNAについて発現解析を行った。今回の検討でCe-miR-39-1の補正に

よるmiR-125aがAERRPS群で有意に高発現だった。血清miR-125は急性虚血性脳梗塞や一過性脳梗塞の患者群で(健常群と比較し)高発現で、頭部CTによる画像診断より高感度のバイオマーカーとして報告がある。(Tiedit S et al. Circ Res.2017.121:970-980.) 今後も症例蓄積をした結果の再現性評価や、Inflammatory Pathway miRNA arrayを用いてmiRNAターゲット数を増やした検討を進める予定である。また今後の血清を使用したmiRNA発現解析の懸案事項としては、(細胞性miRNAとは異なり)分泌性miRNAで恒常的に安定発現しているリファレンス遺伝子が確立していない点が挙げられる。今後の検討では血清で安定して発現があるリファレンス遺伝子の再検討も進める予定である。

将来的には急性脳炎脳症の多施設レポジトリ体制を生かして、AERRPS群だけではなく、すでに集積を進めているAESDをはじめとした他の症候群においてもmiRNA発現解析を進め、急性脳炎・脳症の症候群毎の診断バイオマーカーの探究へ発展させたいと考えている。

E. 結論

血清miRNAは非侵襲的で比較的少量の試料で解析ができるため小児急性脳炎脳症において有用な診断バイオマーカー候補である。今回のAERRPS群における8つの候補miRNAにおける解析では脳梗塞の急性期バイオマーカーとして報告のある血清miR-125aが疾患群において高発現を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Thermolabile polymorphism of carnitine palmitoyltransferase 2: A genetic risk factor of overall acute encephalopathy. Shibata A, Kasai M, Hoshino A, Miyagawa T, Matsumoto H, Yamanaka G, Kikuchi K, Kuki I, Kumakura A, Hara S, Shiihara T, Yamazaki S, Ohta M, Yamagata T, Takanashi JI, Kubota M, Oka A, Mizuguchi M. Brain Dev. 2019 Nov;41(10):862-869.

インフルエンザ脳症の最新の動向 急性脳症の全国疫学調査の結果から. 水口雅、葛西真梨子、柴田明子、星野愛. 厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患政策研究事業・急性脳症研究班. 小児科臨床. 2019. 72(9). 1395-1399.

2. 学会発表

急性脳症における CPT2 熱不安定性多型解. Analysis of the thermolabile CPT2 polymorphism in acute encephalopathy. 柴田明子, 葛西真梨子, 星野愛, 岡明, 水口雅. 第 122 回日本小児科学会学術集会, 金沢, 2019/04/19-21.

急性脳症の第二回全国疫学調査. The Second Epidemiologic Survey of acute encephalopathy in Japan. 葛西真梨子、柴田明子、星野愛、岡明、水口雅. 第 122 回日本小児科学会学術集会, 金沢, 2019/04/19-21.

可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳症における MYRF 関連遺伝子の解析. MYRF -related genetic analysis of mild encephalopathy with a reversible splenial lesion. 倉橋宏和, 沼本真吾, 奥村彰久, 加藤耕治, 遠山美穂, 荻朋男, 星野愛, 水口雅. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/05/31-6/2.

Acute encephalopathy with nonconvulsive status epilepticus in rotavirus gastroenteritis. Ko Hirata, Yuji Sugawara, Sayaka Takeda, Ai Hoshino, Satoko Kumada, Takeshi Hasegawa. The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya. 31 May-1 June. 2019

Association of rare nonsynonymous variants of SCN1A with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Akiko Shibata, Mariko Kasai, Ai Hoshino, Taku Miyagawa, Atsushi Ishii, Shinichi Hirose, Akira Oka, Masashi Mizuguchi. The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya. 31 May-1 June. 2019.

Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion: Comparison between influenza and HHV6/7. Mariko Kasai, Akiko Shibata, Ai Hoshino, Akira Oka, Masashi Mizuguchi. The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya. 31 May-1 June. 2019.

Thermolabile polymorphism of carnitine palmitoyltransferase 2: a genetic risk factor of overall acute encephalopathy. Akiko Shibata, Mariko Kasai, Ai Hoshino, Taku Miyagawa, Akira Oka, Masashi Mizuguchi. 15th Asian Oceanian Congress of Child Neurology, Kuala Lumpur, Malaysia. 19 Sep- 22 Sep.

Epidemiology of Acute Encephalopathy in Japan, 2014-2017. Mariko Kasai, Akiko Shibata, Ai Hoshino, Akira Oka, Masashi

Mizuguchi. 15th Asian Oceanian Congress
of Child Neurology, Kuala Lumpur,
Malaysia. 19 Sep- 22 Sep.

G . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし