

microRNAに着目した脳炎脳症の早期診断バイオマーカー探索研究  
－ 急性脳症班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した急性脳炎・脳症の多施設レポジトリ体制を生かして難治頻回部分発作重積型急性脳炎（AERRPS）を対象にてんかんと区別する血清miRNAに着目してバイオマーカー探索研究を実施した。Pathway-focused miRNA PCR Arrayを用いて148のmiRNAをリアルタイムPCRで定量解析を行い、miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5pはてんかん群と比較しAERRPS群で有意に高発現、miR-215-5pは有意に低発現を示し、AERRPSにおけるバイオマーカー候補および病態解明に有用な糸口になる可能性がある。

### 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、より早期に鑑別しうる高感度かつ小児患者において非侵襲的な診断バイオマーカーが求められている。

microRNA (miRNA) は20数塩基長のnon-coding RNAで、標的メッセンジャーRNAに相補的に結合し転写制御を調節する役割が知られている。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、主に難治頻回部分発作重積型急性脳炎（AERRPS）を対象に、病初期にてんかんと鑑別するためのバイオマーカー探索を目的とし、患者血清を用いてmiRNA発現を比較した。

### B. 研究方法

AERRPS 10例（年齢1歳-11歳7ヶ月、男児8例、女児2例）。難治てんかん 10例を対照群とした。血清（200  $\mu$ l）よりmiRNA抽出キットを用いてRNAを抽出。逆転写反応で得られたcDNAについてPathway-focused miRNA PCR Arrayを用いて148のmiRNAをリアルタイムPCRで定量解析した。恒常的に発現する3つの補正用miRNA（Ce-miR-39-3p、miR-15b-5p、miR-21-5p）を用いて、比較Ct法で各miRNA発現を両群間で比較した。

（倫理面への配慮）

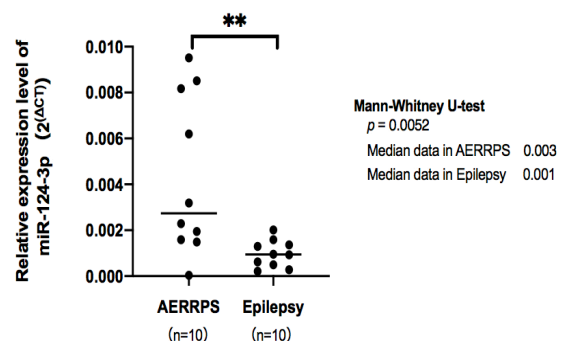
本研究は東京大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理審査を受け承認されている（承認番号G3504-(17)）。レポジトリ試料を用いた共同研究は東京都医学総合研究所の倫理審査も承認されている。個人情報、匿名化を行い、第三者による個人の特定ができないように配慮した。患者または保護者に対し、当該の検査の目的、不利益、危険性について主治医より十分説明を行い、文書による同意を得られた場合にのみ研究を進めた。

### C. 研究結果

#### I. miR-124-3p

Ce-miR-39\_1、miR-15b-5p、miR-21-5pの補正によるmiR-125aはAERRPS群で有意に上昇していた（ $p=0.0005$ 、 $p=0.028$ 、 $p=0.063$ ）【図1】

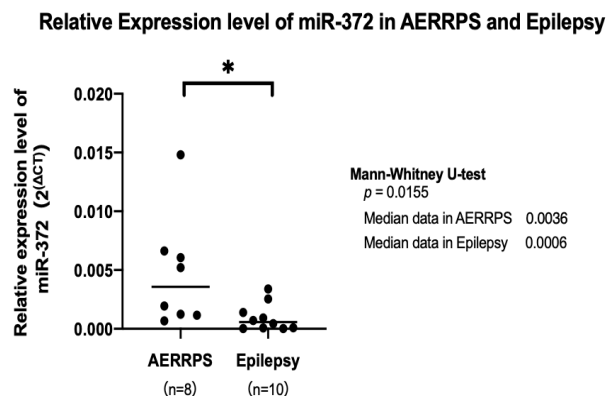
Relative Expression level of miR-124-3p in AERRPS and Epilepsy



【図1】 AERRPS群、難治てんかん群におけるmiR-124-3p発現比較(\*補正はCe-miR-39\_1を使用)

## II. miR-372-3p

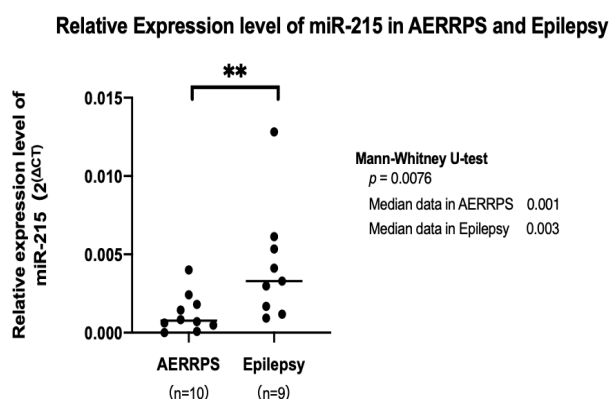
Ce-miR-39\_1, miR-15b-5p, miR-21-5p の補正による miR-372-3p は AERRPS 群で有意に高発現であった ( $p=0.016$ ,  $p=0.068$ ,  $p=0.003$ ) 【図 2】



【図 2】 AERRPS 群、難治てんかん群における miR-372-3p 発現比較 (\* 補正は Ce-miR-39\_1 を使用)

## III. miR-215-5p

Ce-miR-39\_1, miR-15b-5p, miR-21-5p の補正による miR-215-5p は AERRPS 群で有意に低発現であった ( $p=0.008$ ,  $p=0.028$ ,  $p=0.006$ ) 【図 3】



【図 3】 AERRPS 群、難治てんかん群における miR-215-5p 発現比較 (\* 補正は Ce-miR-39\_1 を使用)

## D. 考察

本研究で miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5p は難治てんかん群と比較し AERRPS 群で有意に高発現、miR-215-5p は有意に低発現を示し、両群を区別するバイオマーカー候補となる可能性が示唆された。AERRPS 群で発現の増加していた 3 つの miRNA は neurotrophin signaling や axon guidance などの中枢神経系経路に関連し、脳に高発現していた。血清中の miRNA 解析ではあるものの脳内の事象を反映した情報が得られる可能性が示された。また miRNA-124-3p はミクログリアでの中枢性炎症の作用が知られており、AERRPS の

病態解明の手がかりになる可能性があり、今後集積を蓄積した検証が求められる。

## 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 群における網羅的な miRNA 解析では血清 miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5p、miR-215-5p がバイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Epidemiological changes of acute encephalopathy in Japan based on national surveillance for 2014-2017. Kasai M, Shibata A, Hoshino A, Maegaki Y, Yamanouchi H, Takanashi JI, Yamagata T, Sakuma H, Okumura A, Nagase H, Ishii A, Goto T, Oka A, Mizuguchi M. Brain Dev. 2020 Aug;42(7):508-514.

2) Case-control association study of rare nonsynonymous variants of SCN1A and KCNQ2 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Shibata A, Kasai M, Terashima H, Hoshino A, Miyagawa T, Kikuchi K, Ishii A, Matsumoto H, Kubota M, Hirose S, Oka A, Mizuguchi M. J Neurol Sci. 2020 Jul 15;414:116808.

### 2. 学会発表

1) 星野愛、佐久間啓、長谷川節子、松岡貴子、多田弘子、葛西真理子、柴田明子、岡明、水口雅 難治頻回部分発作重積型急性脳炎患者の血清 miRNA に着目したバイオマーカー探索研究の試み. Genetic background in Japanese patients with acute necrotizing encephalopathy. 第 62 回小児神経学会学術集会, 新潟, 2020 年 5 月 28 ~ 5 月 30 日, Web 開催

2) 星野愛、葛西真理子、柴田明子、高梨さやか、高橋尚人、岡明、牛島廣治、水口雅. 胃腸炎関連急性脳症の発症リスク要因の多面的検討 — 患者背景調査と IL10 遺伝子多型の関連解析 — Risk factors in Japanese patients with gastro-enteritis-associated acute encephalopathy. 第 123 回小児科学会学術集会, 2020 年 8 月 21 日 ~ 8 月 23 日, 神戸, ハイブリット開催

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特記事項なし

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他