

令和 6 年 7 月 12 日現在

機関番号：82823

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15700

研究課題名（和文）急性脳症の早期診断と治療に向けた血液・髄液microRNA解析

研究課題名（英文）Blood and spinal fluid microRNA analysis for early diagnosis and treatment of acute encephalopathy

研究代表者

星野 愛 (Ai, Hoshino)

地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立神経病院（臨床研究室）・神経小児科・医師

研究者番号：90801928

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は急性脳症と鑑別を要するけいれん性疾患を発症早期に区別する低侵襲性バイオマーカー探索を目的に、Cell-free miRNAに着目してmiRNA発現を比較した。急性脳症亜群の難治頻回部分発作重積型急性脳炎10例および小児てんかん10例の血清を用いてPathway-focused miRNA PCR Arrayで148のmiRNAをリアルタイムPCR定量解析および比較Ct法で発現比較した。miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5pは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となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性脳症は希少疾患である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、発症時は熱性けいれんなどのけいれん性疾患との鑑別が困難で確定診断に数日を要する。臨床現場では急性脳症と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。本検討では小児急性脳炎脳症の亜群である難治頻回部分発作重積型急性脳炎においてけいれん性疾患と区別する有用な診断バイオマーカー候補が同定された。今後は本研究成果をもとに小児急性脳炎脳症の低侵襲性かつ早期診断として有用なバイオマーカーとして臨床応用へ発展させる一助になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study focused on cell-free miRNAs to compare miRNA expression in the search for a minimally invasive biomarker to distinguish seizure disorder from acute encephalopathy in the early stage of disease onset. We compared the expression of 148 miRNAs by real-time PCR quantitative analysis and comparative Ct method using Pathway-focused miRNA PCR Array in serum from 10 cases of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures: AERRPS and 10 cases of pediatric epilepsy. miR-124-3p, miR-372-3p and miR-145-5p were significantly up-regulated in the AERRPS group, while miR-215-5p was significantly down-regulated, suggesting that miRNAs may be as biomarkers to distinguish between the two groups.

研究分野：小児神経学

キーワード：急性脳症 microRNA 難治頻回部分発作重積型急性脳炎 小児けいれん性疾患 早期診断バイオマーカー

# 急性脳症の早期診断と治療に向けた血液・髄液 microRNA 解析

星野 愛 (地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立神経病院 (臨床研究室))

## A. 研究目的

小児急性脳症は希少疾患であるが、一定数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。

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  $\mu$ 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。

本研究は急性脳症の亜群である難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (AERRPS) を対象に鑑別となる小児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

AERRPS 10 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、2 つの Pathway-focused miRNA PCR Array (Human serum and Plasma plate, Human Inflammatory response plate) を用いて 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, miR-21-5p) を用いて両群間の各 miRNA 発現を比較した。

### (倫理)

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))。共同研究として東京都医学総合研究所・都立神経病院の倫理審査も承認されている。

## C. 研究結果

### 1) miR-124-3p

Ce-miR-39\_1 の補正による miR-124-3p は AERRPS 群で有意に上昇していた ( $p=0.0005$ ) また、miR-15b-5p の補正による解析においても有意に疾患群で高発現であった ( $p=0.028$ )。miR-21-5p の補正による解析においても miR-124-3p は疾患群で高発現の傾向がみられた

### 2) miR-215-5p

Ce-miR-39\_1 の補正による miR-215-5p は AERRPS 群で有意に低発現であった ( $p=0.008$ ) また、miR-15b-5p 及び miR-21-5p の補正による解析においても有意に疾患群で低発現であった ( $p=0.028$ ,  $p=0.006$ )

### 3) miR-372-3p

Ce-miR-39\_1 の補正による miR-372-3p は AERRPS 群で有意に高発現であった ( $p=0.016$ ) また、miR-21-5p の補正による解析においても有意に疾患群で高発現であった ( $p=0.003$ )。miR-15b-5p の補正による解析においても miR-372-3p は疾患群で高発現の傾向がみられた。

### 4) miR-145-5p

Ce-miR-39\_1, miR-15b-5p, miR-21-5p の補正による miR-145-5p は AERRPS 群で高発現の傾向はあった ( $p=0.022$ ,  $p=0.228$ ,  $p=0.243$ )。

## D. 考察

小児急性脳炎脳症の一症候群である AERRPS において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 miRNA について発現解析を行った。今回の検討で Ce-miR-39-1 を含む 3 つの miRNA での補正による miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5p は、AERRPS 群で高発現、miR-215-5p は低発現を示した。

AERRPS 群の血清試料で有意に高発現を認めた miR-124 は、一般的に自己免疫性脳炎実験マウスモデルにおいて脳内特異的発現の miR-124 がミクログリアの中枢性炎症を抑制する機能が知られている。(Ponomarev D E et al. *Nat Med.* 2011) 一方でてんかんのモデルでは *in vivo* で miR-124 を投与したところ逆に炎症性サイトカインの産生を増強させたという報告もあり、miR-124 の作用は context-dependent の可能性も示唆された。

今後も症例蓄積をした結果の再現性評価は必要であるが、AERRPS 群と鑑別となる小児てんかん群を区別するバイオマーカー候補が同定された。

## 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 群における候補 miRNA における解析では自己免疫性脳炎実験マウスモデルにおいて中枢性炎症を抑制する機能が知られている miR-124 を含む血清 miR-124-3p、miR-372-3p、miR-145-5p が診断バイオマーカー候補として同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuguchi M, Shibata A, Kasai M, Hoshino A.	4. 巻 17
2. 論文標題 Genetic and environmental risk factors of acute infection-triggered encephalopathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 01-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 42(7)
2. 論文標題 Epidemiological changes of acute encephalopathy in Japan based on national surveillance for 2014-2017.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 508-514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2020.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 41
2. 論文標題 Thermolabile polymorphism of carnitine palmitoyltransferase 2: A genetic risk factor of overall acute encephalopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Dev.	6. 最初と最後の頁 862-869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2019.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 72
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 1395-1399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Kanazawa H, Hoshino A, Takamatsu R, Watanabe R, Hoshi K, Ishii W, Yahikozawa H, Mizuguchi M, Sato S.	4. 巻 61
2. 論文標題 Acute necrotizing encephalopathy and a carnitine palmitoyltransferase 2 variant in an adult.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of clinical neuroscience	6. 最初と最後の頁 264-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2018.11.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino A, Takahashi N, Oka A, Mizuguchi M	4. 巻 17
2. 論文標題 Association of IL6 and IL10 gene promotor polymorphisms with susceptibility to acute necrotizing encephalopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1231957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1231957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 星野愛、佐久間啓、多田弘子、葛西真梨子、柴田明子、水口雅
2. 発表標題 血清miRNAに着目した難治頻回部分発作重積型急性脳炎の網羅的バイオマーカー探索. Serum microRNA comprehensive analysis for acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures.
3. 学会等名 第63回小児神経学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第62回小児神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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。
2. 発表標題 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 gastroenteritis-associated acute encephalopathy.
3. 学会等名 第123回小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 葛西真梨子、柴田明子、星野愛、岡明、水口雅。
2. 発表標題 急性脳症の第二回全国疫学調査 . The Second Epidemiologic Survey of acute encephalopathy in Japan.
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Kasai , Akiko Shibata , Ai Hoshino, Akira Oka, Masashi Mizuguchi.
2. 発表標題 Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion: Comparison between influenza and HHV6/7.
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野愛、齋藤真木子、久保田雅也、高梨潤一、岡明、水口雅。
2. 発表標題 急性壊死性脳症における遺伝的リスクファクター。
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野愛, 倉橋宏和.
2. 発表標題 急性脳症の最新知見 急性脳症の遺伝的素因.
3. 学会等名 第60回日本小児神経学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関