

令和 2 年 9 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10906

研究課題名(和文) 正常圧水頭症とパーキンソン症候群の鑑別の為の髄液マーカーの探索と病態の解明

研究課題名(英文) Potential cerebrospinal fluid marker for discriminating Parkinson syndrome from idiopathic normal pressure hydrocephalus based on microRNA search

研究代表者

宮嶋 雅一 (Miyajima, Masakazu)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60200177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特発性正常圧水頭症(iNPH)は、進行性核上麻痺(PSP)と臨床症状が類似すること、また、しばしば両者は併存することから、臨床症状のみでは両者の鑑別は困難である。現状では両疾患の原因は不明であり、特異的な定量検査法はない。本研究では髄液中のmicroRNAに着目し、iNPHとPSPの鑑別診断に有用な信頼性の高いmicroRNAsを同定した。更に、同定されたmicroRNAsのtarget遺伝子の機能解析により、Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Q (PTPRQ)がPSPで特異的に発現が増加していることを発見し、ELISAによる簡便な検査法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された髄液中のProtein Tyrosine Phosphatase Receptor Qの測定により、特発性正常圧水頭症(iNPH)に合併した進行性核上麻痺(PSP)の診断が可能となり、iNPHの予後予測や術後管理を容易にする。また、脳実質と髄液腔には関門はない為、分子量の小さなmicroRNAは、自由に脳間質と髄液腔とを交通していると考えられる。現在治療法のないPSPの新たな治療法として、本研究で同定されたmicroRNAsに相補的なmicroRNAsを髄液内へ投与し、標的遺伝子の発現を変化させる事より、PSPの予防と症状の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Since idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH) has clinical symptoms similar to progressive supranuclear palsy (PSP), and both often coexist, it is difficult to distinguish the two from the clinical symptoms alone. At present, the causes of both diseases are unknown, and there is no specific biomarker. In this study, we focused on microRNA in cerebrospinal fluid and identified highly reliable microRNAs useful for differential diagnosis of iNPH and PSP. Furthermore, functional analysis of the target gene of the identified microRNAs revealed that the expression of Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Q (PTPRQ) was specifically increased in PSP, and a simple method by ELISA was established.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：特発性正常圧水頭症 進行性核上性麻痺 髄液 バイオマーカー マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

進行性核上性麻痺(Progressive supranuclear palsy: PSP) は、垂直性眼球運動障害、姿勢不安定性、認知機能障害を呈する症候群であり<sup>1</sup>、タウ蛋白の蓄積(タウオパチー)を特徴とし、パーキンソン症候群のひとつとして分類される<sup>2,3</sup>。診断は臨床症候により行われ、確定診断は剖検脳を用いた病理診断によってのみ可能となる<sup>4,5</sup>。有効な治療法の開発のみならず、診断に有用なバイオマーカーさえ確立されていないのが現状である。更に、PSP はパーキンソン病(Parkinson's disease: PD)と比較すると、進行が早く、転帰も不良である傾向にあり、ドーパミンによる治療も奏功しないことが多い。また、PSP は典型像である Richardson 症候群以外にも、様々な臨床亜型が存在する<sup>6</sup> ことに加え、しばしば他の神経変性疾患を合併することもあり、複雑な臨床像を呈することで、より診断が困難となる。特発性正常圧水頭症(idiopathic normal pressure hydrocephalus: iNPH) は、認知機能障害、歩行障害、排尿障害を三徴とする高齢者特有の神経変性疾患である<sup>7</sup>。髄液循環障害を病態基盤とし<sup>8,9</sup>、髄液シャント術という有効な治療法があることから、診断の重要性が高い認知症性疾患である<sup>10</sup>。一方で、iNPH の臨床像はアルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)、レビー小体型認知症、PSP、PD など他の神経変性疾患との鑑別がしばしば困難であり、またこれらの神経変性疾患の合併例も存在する<sup>11,12</sup>。したがって、剖検による病理診断が唯一の確定診断となることが、臨床上の問題点である。

特に iNPH と PSP の鑑別診断は困難であり、その背景には、両者の特徴的な症状である歩行不安定性や早期から出現する認知機能障害など臨床像の類似性が高いことがある<sup>13,14</sup>。更に、PSP の MRI 画像の特徴である第三脳室の拡大やシルビウス裂の開大などが iNPH でも見られること<sup>15</sup>、PSP の特徴的 MRI 画像所見である中脳被蓋の萎縮を示すいわゆる "humming bird sign" は病期が進行しないと顕著とならないこと<sup>16</sup>、PSP と iNPH の鑑別に有用なドーパミントランスポーターイメージング(DaT スキャン)は、定量的な基準が施設間で異なり、相対的基準にとどまる<sup>17</sup> ことが挙げられる。また、前述の通り、両者ともに特異的診断バイオマーカーが存在しないことも問題点である。

microRNA は約 19-25 個の塩基からなる一本鎖 RNA で、messenger RNA に結合し遺伝子発現を調節することが知られている<sup>18-20</sup>。microRNA は細胞内でその機能を発揮するが、髄液を含む全身の細胞外液にて定量が可能である<sup>21,22</sup>。これらのことから、髄液中 microRNA は神経変性疾患の病態を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆される。近年、AD や PD など様々な神経変性疾患におけるバイオマーカーとしての microRNA の役割に注目が集まっている<sup>23-29</sup>。これらの先行研究から、microRNA の変動による、標的遺伝子の発現の変化が、神経変性疾患における病態蛋白の蓄積に関与している可能性が強く示唆される<sup>30</sup>。我々の先行研究では、髄液中 microRNA has-miR-4274 が iNPH とパーキンソン症候群の鑑別に有用であることを示した<sup>31</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、パーキンソン症候群の中から PSP に焦点を絞り、iNPH との鑑別を可能にする髄液中 microRNAs を抽出する。更に、それらの microRNAs により調節を受ける遺伝子(蛋白)を探索することにより、PSP に特異的な髄液バイオマーカーを確立することを目的とする。このこと

は両疾患の病態解明、更に、治療法のない PSP の新たな治療法の開発にも寄与すると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究は、2008年9月から2015年9月に順天堂大学附属順天堂医院の脳神経内科及び脳神経外科にて髄液採取を行った症例を対象とし、異なる3つのコホートをを用いた3段階の解析により行った。症例は後述の診断基準に従って神経内科専門医および脳神経外科専門医により診断された。第1コホートはPSP3例・iNPH3例・PD1例・AD1例の患者から採取した髄液を、qRT-PCR arrayにより、既知の1008個のmicroRNAsのうち、PSPで特異的に発現が変化していた6個のmicroRNAsを抽出した。第2コホートはPSP10例、iNPH10例、PD12例、AD10例を対象として、髄液中のこれらのmicroRNAsをqRT-PCRを用いて測定した。第3段階として、公開されたmicroRNAデータベースを用いて、選定されたmicroRNAsに関連のある遺伝子(蛋白)を抽出した。それらの蛋白の特異抗体を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にて、PSP14例・iNPH27例、PD14例、AD15例、健常高齢者(normal control: NC)10例を対象として、髄液中の蛋白濃度を定量した。各疾患の診断は、以下の基準に従って行った。PSPは、NINDS-SPSP criteria<sup>32</sup>におけるProbable PSPとし、iNPHは、本邦のiNPH診療ガイドライン第2版<sup>33</sup>におけるProbable iNPHとし、PDは、MDSによるPDの臨床診断基準<sup>34</sup>におけるPD、ADは、NIA/AAの診断ガイドライン<sup>35</sup>によるADまたは髄液中リン酸化タウ蛋白が60pg/ml以上で髄液中AD病理を有する症例とした。

### 4. 研究の成果

第一段階では、PSP群において低いCt値を示した6個のmicroRNA、すなわちmiR-330-3p (Ct average [SD] = 27.3 [0.57])、miR-525-3p (28.9 [1.00])、miR-511-5p (29.3 [0.59])、miR-548d-3p (29.6 [1.14])、miR-372-3p (29.6 [3.51])、miR-500a-5p (29.6 [0.58])が抽出された。第二段階では、PSPでの発現増加があったのはmiR-330-3p、miR-372-3p、miR-500a-5p、miR-525-3pの4個に絞られた(Ct average [SD] miR-330-3p: PSP 14.6 [1.59]; iNPH 15.9 [1.08]; PD 16.7 [1.61]; AD 17.3 [1.89], miR-372-3p: PSP 16.6 [1.22]; iNPH 18.2 [1.19]; PD 17.8 [0.56]; AD 17.7 [1.13], miR-500a-5p: PSP 12.6 [1.23]; iNPH 14.1 [1.31]; PD 14.6 [1.48]; AD 14.4 [0.79], miR-525-3p: PSP 16.4 [1.23]; iNPH 18.5 [0.94]; PD 18.4 [1.21]; AD 18.5 [0.81])。ROC曲線を用いて解析したPSP vs. iNPHの鑑別は、miR-330-3pはカットオフ値15.89で感度70%・特異度90%でAUC0.750、miR-372-3pはカットオフ値17.77で感度70%・特異度90%でAUC0.815、miR-500a-5pはカットオフ値13.01で感度90%・特異度70%でAUC0.830、miR-525-3pはカットオフ値17.40で感度90%・特異度80%でAUC0.920であった。第三段階では、髄液中PTPRQ濃度average [SD]はPSPで1.42 pg/ml [0.97]、iNPHで0.46 pg/ml [0.23]、PDで0.90pg/ml [1.06]、ADで0.55 pg/ml [0.44]、NCで0.30 pg/ml [0.10]で、有意差をもってPSPでの特異的な上昇が明らかになった。一方で、PTPRZはPSPで0.56 pg/ml [0.15]、iNPHで0.41 pg/ml [0.16]、SLC21はPSPで33.3 pg/ml [20.2]、iNPHで16.8 pg/ml [14.5]で、2群間に明らかな有意差を認めなかった。ROC曲線を用いて解析したPTPRQによるPSP vs. iNPHの鑑別は、カットオフ値0.585 pg/mlで感度85%・特異度82%、AUC0.897であった。

本研究では、髄液中のmiR-330-3p、miR-372-3p、miR-500a-5p、miR-525-3pの発現が、他の神

経変性疾患と比較し PSP で特異的に増加していることを明らかにした。本研究は、PSP における上記 microRNAs および蛋白の発現を解析した初めての研究である。髄液中 microRNA の特質や機能は未解明の部分が多いが、概して髄液中濃度は低いとされる<sup>36</sup>。microRNA は末梢循環において、蛋白-リボ蛋白複合体あるいは小胞含有物として安定的に存在することが知られている<sup>37</sup>。細胞から産生された髄液中の微小分子の中には microRNA も含まれ、これらは神経変性疾患との関連は解明されていないものの、少なくとも細胞シグナリングには関与することが報告されている<sup>38</sup>。PTPRQ は脳だけでなく、全身の多様な臓器において発現が確認されている蛋白である<sup>39</sup>。PTPRQ の中枢神経系における役割は不明であったが、近年、永田らは髄液中 PTPRQ 濃度は iNPH で AD と比較して有意に上昇し、鑑別に有用であること、さらに、マウス脳において PTPRQ は、上皮細胞が繊毛構造を呈するクモ膜顆粒および脈絡叢に多く発現していることを報告した<sup>40</sup>。さらに、PTPRQ 欠損マウスは、蝸牛の有毛細胞の欠損または癒合などによる聴覚障害を呈することを明らかにした先行研究<sup>41</sup>や、PTPRQ は内耳有毛細胞に存在する膜蛋白であり、PTPRQ が有毛細胞の機能を調節する機能をもつことを示唆した先行研究<sup>42</sup>と合わせ、永田らは、髄液と接する脳組織における線毛構造の調節に PTPRQ が関与しているのではないかと推測している。髄液中 PTPRQ の上昇は、水頭症病態の基盤となる脳組織における線毛組織の破綻を反映しているのではないかと考えた<sup>40</sup>。これを支持するものとして、脈絡叢が髄液吸収を担う可能性を指摘する先行研究もある<sup>43,44</sup>。

本研究で示唆された、microRNA とその標的蛋白との関連や、両者の髄液中発現量を考察する際に注意すべきことは、ひとつの microRNA は何百もの蛋白をその下流に持ち得、同様にひとつの蛋白は何百もの microRNA による制御を受けている可能性があり、一対一対応とは決して言えないことである<sup>38</sup>。したがって、本研究のみで microRNA のネットワークパスウェイの全貌を明らかにすることや、特定の microRNA および蛋白の髄液中発現が神経変性疾患の脳内でどのように機能しているかを論じることはできない。加えて、本研究におけるその他の limitation として、症例数が少なく、単一施設における研究であること、疾患分類において病理学的検討がなされていないことなどが挙げられる。しかしながら、髄液中の miR-330-3p、miR-372-3p、miR-500a-5p、miR-525-3p、および PTPRQ の発現が安定的に定量でき、PSP と iNPH の鑑別に有用であることを示唆した結果は、今後さらに症例数を増やして検討する価値のあるものといえる。

## 参考文献

1. Steele JC, et al. Arch Neurol; 10: 333-359, 1964
2. Hauw JJ, et al. Neurology 44: 2015-2019, 1994
3. Litvan I, et al. J Neuropathol Exp Neurol; 55: 97-105, 1996
4. Gilman S, et al. Neurology; 71: 670-676, 2008
5. Hughes AJ, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry; 55: 181-184, 1992
6. Lopez G, et al. Acta Neurol Scand; 134: 242-249, 2016
7. Marmarou A, et al. Neurosurgery Suppl 57: S1 -S3, 2005
8. Silverberg, G. D. Brain. 127, 947-948, 2004

9. Johanson, C. E. et al. *Cerebrospinal Fluid Res.* 5, 10, 2008
10. Nakajima M,et al. *Front Neurol* 7;9:421, 2018
11. Ghosh S & Lipka C. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 29, 583-589, 2014
12. Starr BW, et al. *J Clin Mov Disord* 2014
13. Selge C,et al. *Neurology*; 90 (12), 2018
14. Pilotto A, et al. *Neurodegener Dis*;17:286-291, 2017
15. Cordato NJ,et al. *Brain*,125,789-800, 2002
16. Möller L,et al. *Mov Disord.*;32(5):778-782, 2017
17. Whitwell JL,et al.*Mov Disord.*;32(7):955-971, 2017
18. Grinchuk OV, et al. *Nucleic Acids Res* 38, 534-547, 2010
19. Kim VN. *Mol Cells* 19, 1-15, 2005
20. Marz M, et al. *Neurology*;84:636-638, 2015
21. Sheinerman KS, et al. *Front Cell Neurosci*;7:150-150, 2013
22. Weber JA,et al. *Clin Chem*;56:1733-1741, 2010
23. Starhof C,et al. *Mov Disord*;34(2):246-254, 2019
24. Backes C,et al. *J Transl Med* 13, 224, 2015
25. Danborg PB,et al. *Biomarkers* 19, 259-268, 2014
26. Gaughwin PM,et al. *Hum Mol Genet* 20, 2225-2237, 2011
27. Grasso M,et al. *Molecules* 19, 6891-6910, 2014
28. Margis R,et al.*J Biotechnol* 152, 96-101, 2011
29. Van Giau V, et al. *J Neurol Sci* 360, 141-152, 2016
30. Eacker SM,et al. *Nat Rev Neurosci*;10:837-841, 2009
31. Jurjevic I, et al. *J Alzheimer Dis* 56, 317-325, 2017
32. Litvan I,et al. *J Neuropathol Exp Neurol*; 55: 97-105, 1996
33. Mori E, et al. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 52, 775-809, 2012
34. Postuma RB,et al. *Mov Disord.*30(12):1591-601, 2015
35. McKhann GM,et al. *Alzheimers Dement*;7(3):263-9, 2011
36. Weber JA,et al. *Clin Chem*;56:1733-1741, 2010
37. Arroyo JD,et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*;108:5003-5008, 2011
38. Patz S,et al.*J Neurotrauma*;30:1232-1242, 2013
39. The Human Protein Atlas:
40. Nagata Y,et al. *Mol Med Rep*, 16 (3), 3034-3040, 2017
41. Goodyear RJ,et al.*J Neurosci.*22;32:2762-72, 2012
42. Hirono, M.,et al. *Neuron.* 44, 309-320, 2004
43. Spector R,et al. *Exp Neurol.*273:57-68, 2015
44. Johanson C and Johanson N. *CNS Neurol Disord Drug Targets.*;15(9):1151-1180, 2016

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Jurjevic; I, Miyajima M, Ogino I, Akiba C, Nakajima M, Kondo A, Kikkawa M, Kanai M, Hattori N, Arai H.	4. 巻 56
2. 論文標題 Decreased Expression of hsa-miR-4274 in Cerebrospinal Fluid of Normal Pressure Hydrocephalus Mimics with Parkinsonian Syndromes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis.	6. 最初と最後の頁 317-325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-160848	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 8件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症の基礎と臨床
3. 学会等名 第29回鹿児島ブレインサイエンスカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 病態から見た特発性正常圧水頭症とアルツハイマー型認知症の接点.
3. 学会等名 第4回千葉iNPHミーティング（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症の診断と治療
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症とアルツハイマー型認知症の接点.
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症 (iNPH) とアルツハイマー型認知症との接点.
3. 学会等名 茨城NPHミーティング（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 正常圧水頭症の諸問題 神経変性疾患の併存例について
3. 学会等名 第2回日本脳神経外科認知症学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症の診断に有用な髄液バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第11回日本水頭症脳脊髄液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyajima M
2. 発表標題 Problems in iNPH clinical practice after SINPHONI studies.
3. 学会等名 Asian NPH Forum (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症の診断と治療
3. 学会等名 宮崎神経内科懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋雅一
2. 発表標題 特発性正常圧水頭症の診断と治療
3. 学会等名 生活習慣病を考える会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
研究分担者	中島 円  (Nakajima Madoka)  (50317450)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	