

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462160

研究課題名(和文)脳外傷におけるmiRNAのバイオマーカーとしての有用性の検討

研究課題名(英文)Examination of usefulness of miRNA as biomarker in brain trauma

研究代表者

畠山 哲宗 (Hatakeyama, Tetsuhiro)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90602805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血漿および脳脊髄液中のmiRNA発現パターンやレベルが、非脳外傷患者と異なることを明らかにし、その発現が予後予測因子あるいはバイオマーカーとなる可能性を検討した。頭部外傷患者の血漿をmicroRNA microarrayで測ったところ、絶対的発現量の多いものはmiR-451、miR223、miR-16の3種類であった。髄液中のmicroRNAの変化についてはmiR-451a、miR-21、miR-16の3種類の発現量が多かった。miR-451は全てのmicroRNAのなかで最も発現量が多かった。今後これらのmicroRNA が脳外傷のバイオマーカーになるかどうかはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated that miRNA expression patterns and levels in plasma and cerebrospinal fluid are different from those of non-brain trauma patients and examined the possibility that their expression may be a prognostic factor or a biomarker. Plasma of head injured patients was measured with microRNA microarray, and as a result, there were three types with high absolute expression amount, miR-451, miR 223 and miR-16. Regarding the changes in microRNA in the cerebrospinal fluid, the expression levels of miR-451a, miR-21, and miR-16 were three types. MiR-451 was expressed most in all microRNAs. Further studies are needed to determine whether these microRNAs will become biomarkers of brain trauma from now on.

研究分野：脳神経外科

キーワード：microRNA MiR-451 brain trauma

1. 研究開始当初の背景

MicroRNA (miRNA) は細胞内に存在する長さ約 20~25 塩基ほどのノンコーディング RNA であり、メッセンジャーRNA に結合することで、標的となる種々の遺伝子を翻訳レベルで抑制して、タンパク発現を制御する。約 30% のヒト遺伝子は miRNA による調節を受けていると考えられ、現在まで数千以上の miRNA が同定されている。MiRNA の発現は、1) 異なる細胞や組織型ごとに種類が豊富で特異的である、2) その発現レベルは疾患特異的である、3) 安定しており血漿、血清、脳脊髄液や他の体液からの検出が可能である、との理由でがんや他の疾患の検出、同定や分類などのバイオマーカーとして注目が集められている。近年、ラットの脳外傷モデルにおいて大脳皮質や海馬での miRNA 発現が受傷後急性期に変化すること、また重症脳外傷患者において血漿中の miRNA 発現パターンが健常コントロールと比較して大きく異なることが報告され、miRNA は脳外傷においても細胞や分子レベルで遺伝子発現を調節する重要な mediator であると考えられている。

脳外傷に伴う後遺障害はしばしば重篤で永続するものであり、そのため患者や社会に多大な負担をもたらす。脳外傷に対しては種々の治療法が開発され試みられてきたが、未だ有効な治療法は存在しない。脳低温療法は重症脳外傷に対する大規模な臨床試験で、その有用性が確認されなかったが、現在知られている脳保護法で最も強力な手段であり、多くの脳虚血や脳外傷モデルにおいて、強い脳保護効果が報告されている。脳低温療法は、脳外傷後の炎症性サイトカインやアポトーシス促進タンパク、ストレス誘導遺伝子の発現を制御して脳保護効果を有すると考えられるが、脳低温療法がいかに遺伝子発現を制御しているかの研究は十分にされていない。近年、脳外傷モデルラットにおいて受傷後の脳低温療法により脳内の特定の miRNA レベルが温度感受性に変化することが報告されている。しかしヒトの脳外傷において脳低温療法による miRNA レベルを調べた報告は見当たらない。そこで今回、ヒトの脳外傷において脳低温療法により血漿中および脳脊髄液中の miRNA レベルの変化を調べることを目的とする研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 重症脳外傷患者において、血漿中の miRNA 発現パターンが健常コントロールと比較して大きく異なることが報告されているが、脳外傷患者はしばしば全身の外傷も伴っており、他臓器の外傷が血漿中の miRNA 発現に影響している可能性が否定できない。そこで脳外傷の影響を強く反映すると思われる、脳脊髄液中の miRNA 発現パターンやレベルが、年齢や性別をマッチされた非脳外傷患者と比較して異なることを明らかにする。

(2) 脳外傷の強さと miRNA 発現を比較した

研究は見当たらない。特にスポーツ外傷など脳外傷の程度が軽微(脳震盪)な症例においても血漿中の miRNA 発現パターンが健常コントロールと比較して異なることを明らかにする。

(3) ヒトの脳外傷において脳低温療法による miRNA 発現変化を調べた報告は見当たらない。そこで今回、ヒトの脳外傷において脳低温療法により血漿中および脳脊髄液中の miRNA 発現パターンやレベルの変化を明らかにする。また miRNA 発現パターンやレベルの変化が脳外傷患者の転帰や高次脳機能障害などの後遺障害と関連するかどうかを調べることで予後予測因子としての役割を明らかにする。

(4) それぞれの miRNA は制御するタンパク質が既知あるいは推定されて登録されており、研究の成果は脳低温療法の脳保護メカニズムを遺伝子レベルで解明することが期待される。またスポーツ外傷や被虐待児症候群、ゆさぶり症候群など脳外傷の程度が軽微あるいは外傷の存在が不明な症例における miRNA 発現パターンを知ることで脳外傷のバイオマーカーとなる可能性を追求する。

3. 研究の方法

(1) 重症脳外傷 (GCS8 以下) 患者を対象に、受傷当日 (Day0)、翌日 (Day1)、翌々日 (Day2)、5 日目 (Day5) に血液と脳脊髄液を採取し、miRCURY™ Exosome Isolation Kit を用いて、それぞれ Exosome を含む RNA を精製して、miRNA マイクロアレイ法により miRNA の発現解析を行い、外傷後の経過で発現が有意に変化している miRNA を検出する。

過去の報告で、重症脳外傷患者では健常ボランティアと比べ血漿中の miR-16、miR-92a、miR-765 がバイオマーカーとして既に検出されている。miRNA マイクロアレイ法による miRNA の発現解析には、Agilent® MiRNA Array を用いた。

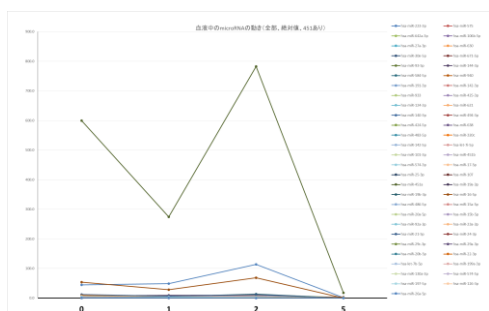
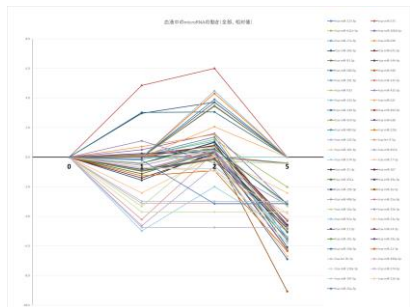
(2) 対照群として、正常圧水頭症患者より採取した髄液を用いて、上記と同様に miRCURY™ Exosome Isolation Kit を用いて Exosome を含む RNA を精製して、miRNA マイクロアレイ法により miRNA の発現解析を行い、外傷後の経過と比較し、発現が有意に変化している miRNA を検出し、バイオマーカーとしての有用性を確認し報告する。

(3) ラットにおいて脳外傷後に受傷 7 ないし 24 時間後に脳組織を摘出し、RNA を精製した過去の報告では、miR-874 と miR-451 の著明な変動が報告されている。今回、ヒトの髄液および血液において、報告と同様に miRNA の発現に明らかな変化が認められるかを過去の報告と照らし合わせて再確認する。

4. 研究成果

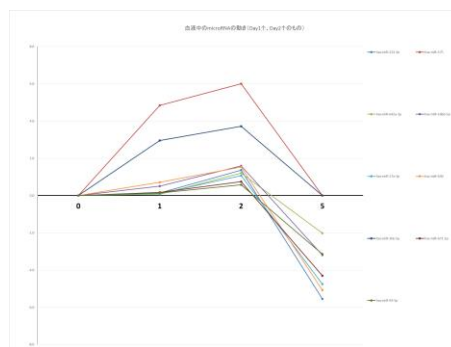
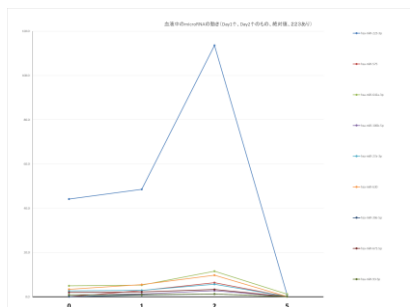
(1) まずは頭部外傷患者に対して、比較的

侵襲の少ない血漿を用い、経過中のタイムポイントを4点とり、それぞれ (Day0、Day1、Day2、Day5) の microRNA の発現量を microRNA microarray で測ったところ、変動のあった microRNA は 55 種類であった。その中で血漿中の特に絶対的発現量の多いものは miR-451、miR-223、miR-16 の 3 種類であり、過去の文献と照らしても同等と考えられ、実験系としてはうまく働いていることが確認された (下図参照)。

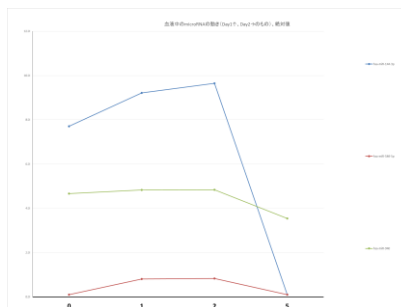
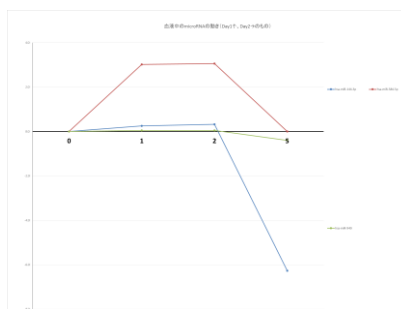


興味深いことに、変動のあった microRNA に関して、Day5 ではほとんどの microRNA については Day0 と同等、あるいは減少傾向にあった。よって、以下に Day0 から Day1 および Day1 から Day2 の変化について分類し、報告する。

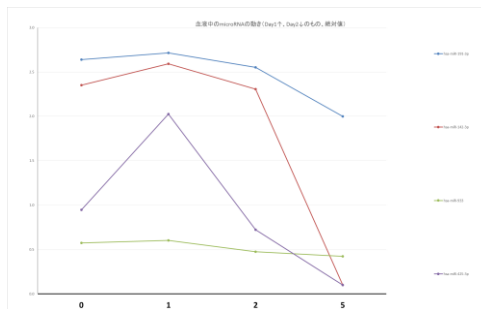
(2) Day1 で上昇し、さらに Day2 も上昇していた microRNA は、9 種類で、絶対発現量が特に多いものは miR-223、miR-642a、miR-630、miR-575、miR-27a であった。Day0 を基準として相対的な変化が大きかったものは miR-575 および miR-30e であった。(下図参照)



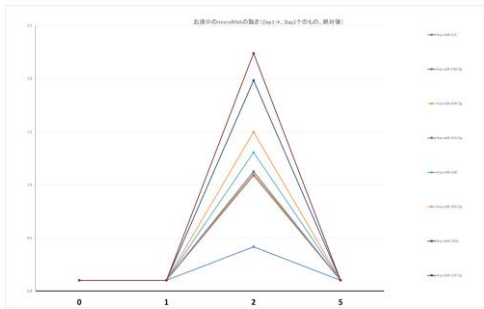
(3) Day1 で上昇し、Day2 で変動のなかった microRNA は、3 種類のみで、発現量絶対値の順で miR-144 > miR-940 > miR-584、発現量変化相対値で miR-584 > miR-144 > miR-940 であった。(下図参照)



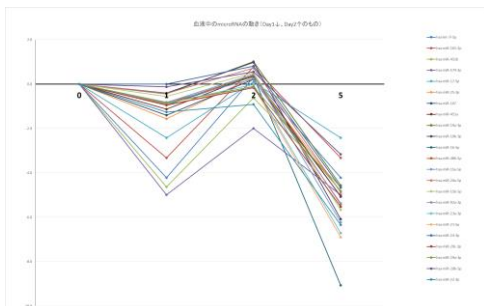
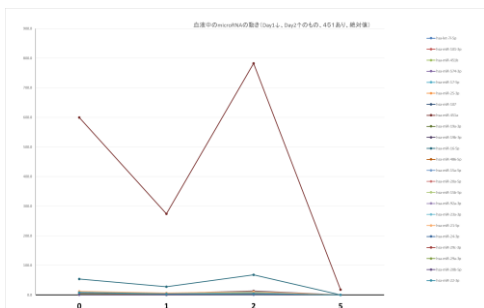
(4) Day1 で上昇し、Day2 で減少した microRNA は、4 種類で、miR-425、miR-142、miR-191、miR-933 であったが、絶対値の発現量が多かったものは miR-425 のみであった。(下図参照)



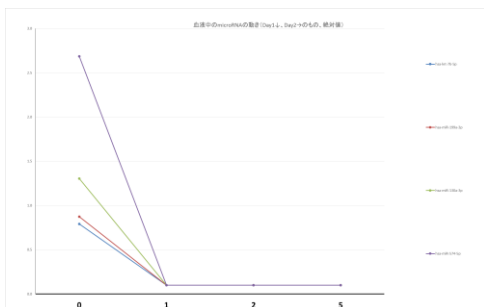
(5) Day1 で変動がなく、Day2 で上昇した microRNA は、8 種類あったが、変動の多かった microRNA は、miR-142、miR-320c、miR-483、miR-638 であった。(下図参照)



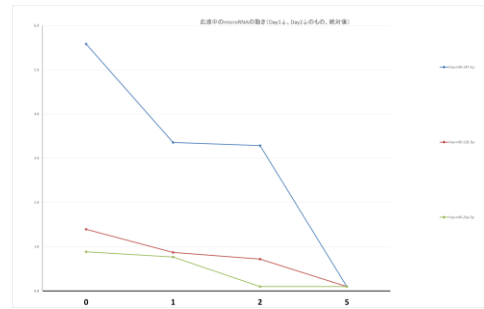
(6) Day1 で減少し、Day2 で増加した microRNA は、23 種類あり、絶対値の高かった microRNA は、miR-451a、miR-16、miR-19b であり、相対的変化量の多かった microRNA は、miR-574、miR-451b、miR-let7i、miR-101、miR-17、miR-25 であった。(下図参照)



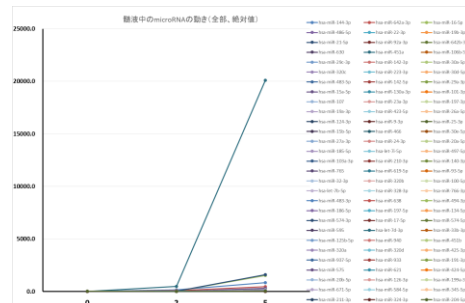
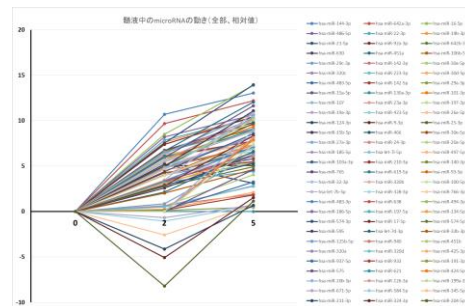
(7) Day1 で減少し、Day2 で変動のなかった (対照群のみ高値で、経過中は検出感度以下であった) microRNA は、4 種類で、miR-574、miR-130a、miR-199a、miR-let7b であった。(下図参照)



(8) Day1 で減少し、さらに Day2 も減少した (経過中、徐々に減少した) microRNA は、3 種類で、miR-197、miR-126、miR-26a であった。(下図参照)



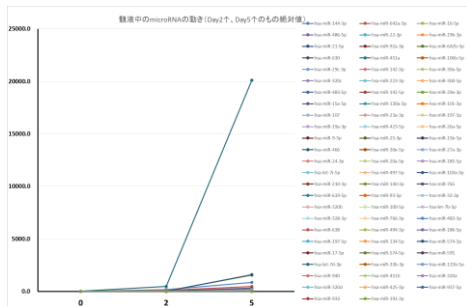
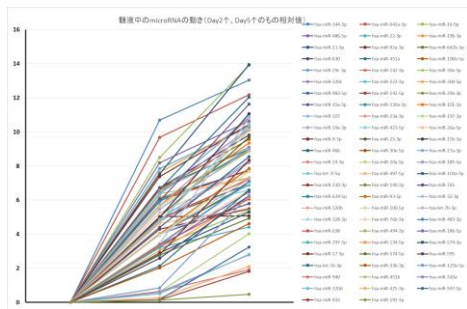
(9) 次に、上記を踏まえた上で、髄液中の microRNA の変化について microRNA assay を行い、microRNA の変動を観察した。それによると、対照となる正常圧水頭症患者の髄液と比較して、外傷後経過中 (Day2、Day5) に髄液中で変動のあった microRNA は、87 種類あり、そのうち miR-451a、miR-21、miR-16 の 3 種類は他の microRNA に比較して圧倒的に発現量が多かった。(下図参照)



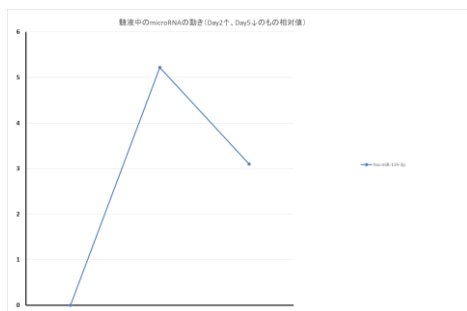
また、変動のあった microRNA の数は、血漿中よりも髄液中のほうが多かった。

興味深いことに、Day5 において、miR-124 以外の microRNA はすべて増加しており、血漿の microRNA がすべて Day5 において Day0 より減少していた変動とは正反対であった。

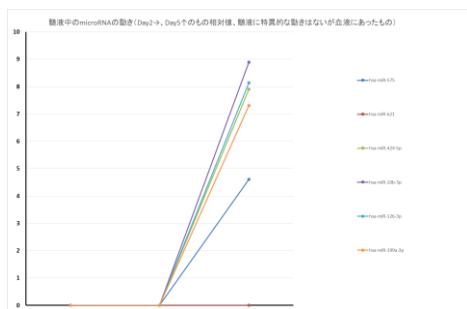
(10) Day2 で増加し、さらに Day5 でも増加した microRNA は、74 種類あり、miR-451a、miR-21、miR-16、miR-144、miR-642a、miR-15a などであった。(下図参照)



(11) Day2 で増加し、Day5 で減少したものは、miR-124 のみであった。(下図参照)



(12) Day2 まで検出感度以下で、Day5 で増加した microRNA は、140 種類であったが、そのうち血漿中に microRNA が検出されたのは 6 種類のみあり、miR-20b、miR-126、miR-424、miR-199a、miR-575 であった。これらは、髄液中の microRNA の動きとして非特異的であり、髄液と関係なく、血漿中のみ特異的な変動のあった 6 種類の microRNA と言える。(下図参照)

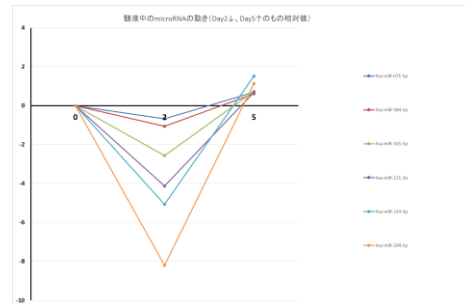


それぞれの血漿中の変動は以下のとおりで、髄液の変動とも一致せず、互いに同じ変動を示したものはなかった。

miR-20b : Day1 ↓、Day2 ↑
miR-126 : Day1 ↓、Day2 ↓

miR-424 : Day1 →、Day2 ↑
miR-199a : Day1 ↓、Day2 →
miR-575 : Day1 ↑、Day2 ↑

(13) Day2 で減少し、Day5 で増加した microRNA は、6 種類あり、miR-204、miR-324、miR-211、miR-345、miR-584、miR-671 であった。(下図参照)



(14) 過去の報告との比較では、健康人血液との比較において、重症患者では miR-16、miR-92a は経過中低下し、miR-765 が有意に上昇していた。ただし、miR-765 に関しては中等度の患者では検出されなかった。本報告では、miR-16、miR-92a は過去の報告通り、Day1 で発現が減少し、Day2 以後は上昇していた(結果(6)参照)。一方で、本症例は重症患者に分類されるが、miR-765 に関しては、検出されなかった。

別の報告にあった miR-874 に関しては、本結果では発現を認めなかった。一方で、miR-451 に関してはすべての microRNA のなかで最も発現量が多く、血液中では Day1 で減少し、Day2 以後で上昇したが、髄液においては Day2、Day5 とともに増加していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Ogawa D, Ansari KI, Okada M, Miyake K, Tamiya T, Chiocca EA, Bronisz A, Godlewski J. Glioma adapt to micro-environment by regulating glucose metabolism depending on microRNA. 第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
- ② Ogawa D, Matsumoto A, Kochi M, Okada M, Miyake K, Tamiya T, Chiocca EA, Godlewski J. Glioma cells adapt metabolic stress by regulating mir-451 expression. 13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting. 2016.9 Sydney (Australia)
- ③ 畠山哲宗、三宅啓介、河井信行、田宮隆. 脳外傷後高次脳機能障害の障害部位と神経心理学検査の関連性について. 第 25 回日本意識障害学会、2016 年 7 月、かがわ国際会議場(香

- 川・高松)
- ④ Ogawa D, Okada M, Miyake K, Tamiya T, E. Antonio Ciocca, Jakub Godlewski. MicroRNA Targeting MGMT Prolongs with GBM in vivo. 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2015.11 San Antonio (USA)
 - ⑤ 小川大輔, 岡田真樹, 三宅啓介, 田宮隆, E. Antonio Ciocca, Jakub Godlewski. MicroRNAがグリオーマに与える影響の in vivo における検討. 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会, 2015 年 10 月, ロイトン札幌 (北海道・札幌)
 - ⑥ 河井信行, 畠山哲宗, 三宅啓介, 田宮隆. 脳外傷後高次脳機能障害患者におけるフルマゼニル PET を用いた大脳皮質神経細胞障害部位の検出. 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会, 2015 年 10 月, ロイトン札幌 (北海道・札幌)
 - ⑦ 小川大輔, 河内雅章, 岡田真樹, 三宅啓介, 河井信行, 田宮隆. MicroRNA によるグリオーマの薬剤感受性への影響についての検討. 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014 年 11 月, シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル (千葉・浦安)
 - ⑧ Ogawa D, Miyake K, Tamiya T, E. Antonio Ciocca, Jakub Godlewski. Micro RNA Targeting MGMT Enhances Sensitivity to Themazolomide Therapy in Glioblastoma. 2014 Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting. 2014.10 Boston (USA)
 - ⑨ 小川大輔, 河内雅章, 岡田真樹, 三宅啓介, 河井信行, 田宮隆. 糖代謝関連 microRNA によるグリオーマ細胞遊走能の検討. 第 15 回日本分子脳神経外科学会, 2014 年 9 月, 大手門パルズ (東京)
 - ⑩ 河北賢哉, 阿部祐子, 一二三亨, 河井信行, 田宮隆, 黒田泰弘. 日本外傷データバンクを用いた頭部外傷合併多発外傷の検討. 第 28 回日本外傷学会総会, 2014 年 6 月, 東京ビッグサイト TFT ホール (東京)
 - ⑪ 畠山哲宗, 河井信行, 河北賢哉, 田宮隆. 頭部外傷後意識障害における下垂体機能と FDG - PET の関係について. 第 23 回日本意識障害学会, 2014 年 8 月, ロイトン札幌 (北海道・札幌)
 - ⑫ 河井信行, 畠山哲宗, 川西正彦, 田宮隆. びまん性脳外傷後高次脳機能障害患者におけるフルマゼニル PET を用いた神経細胞障害と高次脳機能

障害との関連. 第 37 回日本脳神経外傷学会, 2014 年 3 月, 学術総合センター (東京)

- ⑬ 河井信行, 畠山哲宗, 村松圭司, 松田晋哉, 田宮隆. DPC データを用いたわが国における重症頭部外傷の現状把握. 第 37 回日本脳神経外傷学会, 2014 年 3 月, 学術総合センター (東京)
- ⑭ 河北賢哉, 一二三亨, 阿部祐子, 河井信行, 黒田泰弘, 田宮隆. 頭部外傷に対する ICP モニタリングの現状～JNTDB【プロジェクト 2009】と当院の比較～. 第 37 回日本脳神経外傷学会, 2014 年 3 月, 学術総合センター (東京)

[図書] (計 2 件)

- ① 河北賢哉. 重症頭部外傷に対する神経集中治療は、脳灌流圧を優先して管理したほうが良い？救急・集中治療「神経集中治療」、総合医学社、28:854-9, 2016
- ② 畠山哲宗. DPC データを用いたわが国の頭部外傷の現状把握の試み. 医研センタージャーナル 研究助成特集号, 33-34, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 哲宗 (HATAKEYAMA TETSUHIRO)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：90602805

(2) 研究分担者

小川 大輔 (OGAWA DAISUKE)
香川大学・医学部・病院助教
研究者番号：70524057

河北 賢哉 (KAWAKITA KENYA)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：10505803