

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670497

研究課題名(和文) マイクロRNAとタンパクの網羅的解析による熱性けいれんに関する分子生化学的研究

研究課題名(英文) Molecular biochemical study on febrile convulsion by the exhaustive analysis of the microRNA and protein

研究代表者

竹内 義博 (Takeuchi, Yoshihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：80188169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研で100例の熱性けいれん患者における末梢血タンパク成分の解析を行った。MAS解析で、ある一定の増加するタンパクの傾向がみられた。そのデータを基に、患者血液のmiRNAパターンの解析を行っている。まだ、有意なmiRNAの変化はみられていないが、熱性けいれんの誘因になる候補タンパクの研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：I analyzed peripheral blood samples from 100 patients with febrile convulsion. Tendency of the protein pattern was obtained by MAS analysis. Based on it, I analyze the miRNA pattern of the patient blood. The change of meaningful miRNA has not been yet seen, but continues a study of candidate protein becoming the motive of febrile convulsions.

研究分野：小児神経

キーワード：熱性けいれん MAS解析 miRNA

1. 研究開始当初の背景

発熱が誘因となる Dravet 症候群や遺伝性てんかん熱性けいれんプラス (GEFS+) では、SCN1B 等の遺伝子が関連していることが報告されているが、熱性けいれん自体の遺伝子については確定していない。熱性けいれん発症時において体内で miRNA、タンパク等の発現が予想される。今回、発作時における血液および髄液中の miRNA、タンパクの解析を網羅的に分析し、年齢依存的にみられる熱性けいれんの発症機序を解明する。さらに臨床的に区別される熱性けいれん単純型と複合型の遺伝的相違を併せて解明し、我が国で頻度の高い熱性けいれんの予防や新たな治療・薬の開発を目指したい。

2. 研究の目的

熱性けいれんは6か月から6歳頃までの乳幼児に、38℃以上の発熱に伴って起きるけいれん性疾患で、原因はいまだ不明である。単なる発達過程にある脳の発熱ストレスと言う漠然とした原因によるものではなく、発症において遺伝子の影響を受けていると考えられる。本研究では200例の熱性けいれん児の血液および髄液からのマイクロRNA(以下miRNA)とタンパクの解析を網羅的に行い、熱性けいれんの原因、病態、頻度、重症度等との関連を解析する。さらに、熱性けいれんにおいて増減したmiRNAおよびタンパクが熱性けいれんを引き起こす機序を動物実験で検証するとともに、遺伝子を特定し、熱性けいれんの発症機序を分子生物学的に明らかにする。

3. 研究の方法

熱性けいれんの血漿miRNAのmiRNA array解析：インフォームドコンセントを行なった上で患者末梢血を採取し、末梢血より血漿を抽出する。血漿から速やかにmirVana PARIS kitを用いてtotal RNAを抽出する。Megaplex human poolによりmiRNAの逆転写を行う。その後、human pool A primerを用いてreal time PCRを行う。対照として、発熱、けいれん

いずれも認めない症例、発熱を伴いけいれんを認めない症例、発熱はないが、けいれんを認める症例も同時にPCR解析を行う。このmiRNA array解析で熱性けいれんで特異的に変化するmiRNA候補を検索する(Beuvink I, et al., Nucleic Acids Res 2007, 35)。

初年度は200例の解析を行う予定である。インフォームドコンセントを行なったうえで患者末梢血を採取し、末梢血より血漿を抽出する。血漿25μlを2%酢酸ナトリウムで透析を行い凍結乾燥を行う。7M Ureaでサンプルを溶解しIPG stripで等電点電気泳動を行い、その後SDS-PAGEによる二次元電気泳動を行う。泳動したゲルはCBB染色により発色解析する。対照として、上記、の症例の解析も同時に行う。熱性けいれんに特異的に発現が増強している、もしくは抑圧されているタンパクスポットをMAS解析により同定する。

4. 研究成果

患者および保護者に研究についてのインフォームドコンセントを行った上で熱性けいれん症例の解析を行った。研究期間に患者100例の末梢血を採取し解析を行った。

1) 熱性けいれん患者における末梢血タンパク成分の解析：患者末梢血より遠心分離により血漿成分を分離している。血漿タンパクの二次元電気泳動し、タンパク成分をナイロンメンブレンに転写したのち、タンパクを染色し特異的に増加するタンパクスポットの検討を行った。患者の血漿タンパク泳動パターンより、発症時に特異的に変化するタンパクスポットについてMAS解析を行った。この結果をもとに、熱性けいれんに特異的に増加する候補タンパクの同定を行っている。

2) 熱性けいれん患者におけるmiRNA発現パターンの解析：採取した末梢血よりnirvana PARIS Kitを用いてtotal RNAを抽出し、Megaplex human poolによりmiRNAの逆転写を行った上で、human

pool A primer を用いて real time PCR を行った。その後、miRNA array 解析では、熱性けいれん患者で特異的に変化する miRNA 候補を検索している。現在のところ、変化する miRNA の傾向は把握できているが、まだ、病因にたどり着く miRNA の同定には至っていない。

熱性けいれん患者の末梢血における、タンパク成分の変化と miRNA の発現パターンの変化の両方向からの解析により、熱性けいれん発症時の引き金（病因）と結びつく成分の同定を試みている。

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）

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Nomura A, Maruo Y, Taga T, Takeuchi Y. Contribution of UGT1A1 variations to chemotherapy-induced unconjugated hyperbilirubinemia in pediatric leukemia patients. *Pediatr Res.* (in press) (査読あり)
2. Maruo Y, Mori A, Morioka Y, Sawai C, Mimura Y, Matui K, Takeuchi Y. Successful every-other-day liothyronine therapy for severe resistance to thyroid hormone beta with a novel THRB mutation; case report. *BMC Endocr Disord.* 2016 Jan 12;16(1):1. doi: 10.1186/s12902-015-0081-7. (in press) (査読あり)
3. Maruo Y, Nagasaki K, Matsui K, Mimura Y, Mori A, Fukami M, Takeuchi Y. Natural course of congenital hypothyroidism by dual oxidase 2 mutations from the neonatal period through puberty. *European Journal of Endocrinology* 2016 Jan 7; pii: EJE-15-0959. [Epub ahead of print] (in press). (査読あり)
4. Maruo Y, Nakahara S, Yanagi T, Nomura A, Mimura Y, Matsui K, Sato H, Takeuchi Y. Genotype of UGT1A1 and phenotype correlation between Crigler-Najjar syndrome type II and Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 31:403-408, 2016. (査読あり)
5. Takikita S, Takano T, Narita T, Maruo Y. Increased apoptosis and hypomyelination in cerebral white matter of macular mutant mouse brain. *Mol Genet Metab Rep.* 4: 25-29, 2015. (査読あり)
6. Sakai T, Sawai T, Shimizu Y, Morimune T, Okuda Y, Maruo Y, Iyoda S, Takeuchi Y. Escherichia coli O121: H19 infection identified on microagglutination assay and PCR. *Pediatrics International* 57: 1001-1003, 2015. (査読あり)
7. Kunitsu T, Koshida S, Tanaka K, Nakahara S, Yanagi T, Maruo Y, Takeuchi Y, Kubota Y. Neonatal Meckel diverticulum: Obstruction due to a short mesodiverticular band. *Pediatr Int.* 57:1007-1009, 2015. (査読あり)
8. Maruo Y, Suzaki M, Matsui K, Mimura Y, Mori A, Shintaku H, Takeuchi Y. A novel large deletion (exons 12, 13) and a missense mutation (p.G46R) in the PAH in a Japanese patient with phenylketonuria. *World J Pediatr.* 11: 181-4, 2015. (査読あり)

9. Maruo Y, Morioka Y, Fujito H, Nakahara S, Yanagi T, Matsui K, Mori A, Sato H, Tukey RH, Takeuchi Y. Bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase variation is a genetic basis of breast milk jaundice. J Pediatr. 165: 36-41, 2014. (査読あり)

[学会発表](計 8件)

1. 高島 光平, 丸尾 良浩, 筒井 英美, 柳 貴英, 伊藤 玲子, 工藤 豊一郎, 重田 孝信, 笠原 群生, 竹内 義博. 高ガラクトース血症を契機に発見された新生児ヘモクロマトーシスの男児例. 第51回日本周産期・新生児医学会学術集会(福岡). 2015年7月10-12日

2. 松井克之, 吉田恵梨, 白石知子, 田川晃司, 柴田晶美, 筒井英美, 三村由卯, 森麻美, 丸尾良浩, 竹内義博. 1型糖尿病患者児に関わる教育関係者に対するワークショップの有用性について. 第49回日本小児内分泌学会学術集会(東京都). 2015年10月8-10日.

3. Takashima K, Maruo Y, Tsutsui H, Yanagi T, Kasahara M, Takeuchi Y. Neonatal Hemochromatosis detected by galactosemia at newborn screening. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Annual Meeting, October 7th-11th, 2015. Washington DC (USA)

4. 中原小百合, 柴田晶美, 筒井秀美, 古川央樹, 柳貴英, 越田繁樹, 丸尾良浩, 竹内義博. 新生児低血糖を契機に発見し得た糖原病 a 型の一例. 第59回日本未熟児新生児学会学術集会(松山). 2014年11月10-12日.

5. 丸尾良浩, Mahdiyeh Behnam, 中原小百合, 松井克之, 森麻美, Mansour Salehi,

Narges Nouri, 竹内義博. UGT1A1の二つの病因性遺伝子変異の存在により Crigler-Najjar症候群I型とII型が混在したイラン人家系. 第59回日本人類遺伝学会, 第20回日本遺伝子診療学会(東京都). 2014年11月19-22日.

6. 國津智彬, 松井克之, 筒井英美, 丸尾良浩, 竹内義博, 位田忍, 恵谷ゆり, 村山圭. 糖尿病を発症したミトコンドリア呼吸鎖異常症 (complex1欠損症)の男児例. 第48回日本小児内分泌学会学術集会(浜松). 2014年9月25-27日.

7. 船曳恵理, 松井克之, 丸尾良浩, 竹内義博, 深見忠輝. ラトケ嚢胞に伴って発症した中枢性尿崩症が治癒した症例. 第48回日本小児内分泌学会学術集会(浜松). 2014年9月25-27日.

8. 丸尾良浩, 長崎啓祐, 松井克之, 森麻美, 筒井英美, 柴田晶美, 深見真紀, 竹内義博. Dual oxidase 2 (DUOX2)異常症の病型の多様さと遺伝子変異. 第48回日本小児内分泌学会学術集会(浜松). 2014年9月25-27日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 義博 (TAKEUCHI, Yoshihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80188169

(2)研究分担者

成田 努 (NARITA, Tsutomu)
滋賀医科大学・医学部・客員助教
研究者番号: 10591836