

—— 研究助成報告 ——

結節性硬化症のてんかんおよび神経発達症に関連する バイオマーカーの探索

奥村 彰久¹⁾, 久恒 智博²⁾, 山形 要人³⁾, 東 慶輝¹⁾, 倉橋 宏和¹⁾,
沼本 真吾¹⁾, 山本 啓之⁴⁾, 夏目 淳⁵⁾, 安部 信平⁶⁾, 池野 充⁶⁾

要旨：結節性硬化症 (TSC) 21 例の血漿中の 6 つの miRNA (hsa-miR21-5p, hsa-miR22-3p, hsa-miR23-3p, hsa-miR27a-3p, hsa-miR30-5p, hsa-miR188-3p) を測定し、てんかんや神経発達症を含む TSC の症状との関連を検討した。hsa-miR30-5p および hsa-miR188-3p はすべての検体で測定感度以下であった。他の 4 つの miRNA 値と年齢との間には有意な相関を認めなかった。心横紋筋腫ありは、hsa-miR21-5p・hsa-miR23-3p・hsa-miR27a-3p が有意に低値、hsa-miR22-3p が低値の傾向を示した。FS の既往ありは、hsa-miR21-5p が有意に低値、hsa-miR23-3p が低値の傾向を示した。網膜過誤腫ありは、hsa-miR21-5 および hsa-miR27a-3p が低値の傾向を示した。活動性てんかんありは、hsa-miR21-5p が低値の傾向を、SEGA ありは、hsa-miR23-3p が高値の傾向を示した。miRNA 値は、神経発達症の有無による相違を認めなかった。miRNA 値は腫瘍性の病変による相違がある可能性が示唆されたが、神経発達症やてんかんなどの中枢神経症状との関連は明確ではなかった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024 ; 35 : 77-84

Key Words : miRNA, 結節性硬化症, てんかん, 神経発達症, バイオマーカー

序論

結節性硬化症 (TSC) は生涯にわたって全身の諸臓器に障害を来す疾患である。責任遺伝子は *TSC1* および *TSC2* で、それらがコードする hamartin と tuberin が複合体を形成し、*Rheb* を介して mTOR 経路の活性を制御している。mTOR 経路は、細胞の成長や増殖・細胞骨格の形成・栄養の取り込みの促進・オートファジーの抑制などに関与している。TSC では mTOR 経路の制御に問題が生じ、年齢に応じて脳・皮膚・眼・

腎・肺など様々な臓器に障害を来す。その中でも、てんかんや神経発達症をはじめとする TSC-associated neuropsychiatric disorders (TAND) は、TSC 患者の生活の質を脅かす重大な問題である。現在まで、TSC における中枢神経症状を客観的に反映するバイオマーカーは知られていない。

miRNA は 20 から 25 塩基長の微小 RNA となる機能性核酸で、ゲノム上にコードされ多段階的な生成過程を経て形成される。miRNA は、その標的 mRNA に対して不完全な相同性を

1) 愛知医科大学医学部 小児科

[〒480-1195 愛知県長久手市岩作雁又1-1]

2) 東京都医学総合研究所 基礎医科学研究分野カルバインプロジェクト

3) 東京都医学総合研究所 脳・神経科学研究分野こどもの脳プロジェクト

[〒156-0057 東京都世田谷区上北沢2丁目1-6]

4) 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学

5) 名古屋大学大学院医学系研究科 障害児(者)医療学寄附講座

[〒466-8560 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65]

6) 順天堂大学医学部 小児科

[〒113-0033 東京都文京区本郷3丁目1-3]

もって結合し、標的mRNAを不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク産生を抑制すると考えられている。共同研究者の久恒らは、先行研究でTSC欠損型のiPS細胞から誘導した神経前駆細胞を用いてmiRNAの発現を解析した(未発表データ)。その結果、*TSC2*^{+/+}および*TSC2*^{+/-}細胞に比べて*TSC2*^{-/-}細胞の培養上清中に存在するエクソソームから回収されるmiRNA量が有意に多いこと、そのmiRNAの中でmTOR経路を抑制する薬剤の投与によって有意に減少するものがあることが判明した。これらの結果から、miRNAの測定がTSCの中樞神経症状のバイオマーカーになる可能性、およびその変化が中樞神経症状の状態を反映する可能性があることが示唆された。

本研究では、てんかんを持つTSC患者の血漿に含まれるmiRNAを解析して、てんかんおよびTANDをはじめとするTSCの症状との関係を検討し、そのバイオマーカーとしての適用可能性を探索した。

方法

対象は愛知医科大学病院小児科、名古屋大学医学部附属病院小児科、順天堂大学医学部附属順天堂院小児科およびその関連施設に通院しているTSCの患者である。TSCの診断は、主治医が修正Gomez基準に基づいて行った。本研究は、愛知医科大学病院倫理審査委員会の承認を取得して施行した。

本研究では、先行研究で*TSC2*欠損型のヒトiPS細胞から誘導した神経前駆細胞において、以下の2つの条件を満たした6つのmiRNA(hsa-miR21-5p, hsa-miR22-3p, hsa-miR23-3p, hsa-miR27a-3p, has-miR30-5p, has-miR188-3p)を測定した。1) *TSC2*^{+/+}および*TSC2*^{+/-}細胞に比べて*TSC2*^{-/-}細胞で発現が増加する。2) mTOR阻害薬投与によって発現が有意に低下する。

対象患者あるいは保護者から文書による同意を取得した後に、採血を行って血漿を分離した。血漿からのmiRNA抽出にはNucleoSpin® miRNA Plasma (MACHEREY-NAGEL)を用い、DNAはrDNaseでオンカラム処理を行い除

去した。カラムに吸着したRNAをRNase-free H₂Oにて溶出し、抽出したRNAからmiRNAの解析を行った。miRNAからのcDNA合成にはTaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)を用い、miRNAにpolyAとアダプターを付加したのち逆転写酵素でcDNAを合成した。さらに増幅後、miRNAに特異的なTaqMan probeとPCRプライマーを含むTaqMan™ Advanced miRNA Assay kit (Applied Biosystems)を用いてqPCRした。内在性コントロールmiRNAとしてhsa-miR16-5pを用い、ターゲットmiRNAの量を比較定量した。定量的解析にはAgilent GeneSpringソフトウェアを用い、測定値はReference症例の測定値との比で表示した。

臨床情報としては、熱性発作(FS)の既往、全身症状として白斑、顔面血管線維腫、心横紋筋腫、腎血管筋脂肪腫(AML)、網膜過誤腫、中樞神経症状として知的発達症、自閉スペクトラム症(ASD)、注意欠如・多動症(ADHD)、頭部MRI所見として上衣下巨細胞性星細胞腫(SEGA)、脳回形成異常、採血時のてんかん発作(活動性てんかん)の有無について調査票を用いて収集した。

TSCの症状の有無によるmiRNA測定値の相違はMann-Whitney U検定を用いて解析した。年齢とmiRNA測定値との相関はPearsonの相関係数を用いて解析した。P値が0.05未満を有意差あり、0.05以上0.10未満を高値または低値の傾向とした。

結果

22例から検体および臨床情報を取得した。そのうち1例は当初TSCと診断されていたが、その後診断基準を満たさず定型発達を示し、*TSC1*・*TSC2*遺伝子にもバリエーションが同定されなかったことから、TSCでないと判断しReference症例として用いた。

対象となった21例の男女比は10:11で、年齢の中央値は9.5歳(範囲0.67~34.3歳)であった。*TSC1*バリエーション1例に、*TSC2*バリエーション12例に認めた。FSの既往は6/21例(28.6%)に認めた。全身症状では、白斑を6/21例(28.6%)に、

Tab. 1 年齢とのmiRNA値との相関

	相関係数	P 値
hsa-miR21-5p	$r = 0.224$	0.329
hsa-miR22-3p	$r = 0.154$	0.504
hsa-miR23-3p	$r = 0.377$	0.0917
hsa-miR27a-3p	$r = 0.317$	0.162

顔面血管線維腫を13/19例(68.4%)に、心横紋筋腫を11/18例(61.1%)に、腎AMLを11/18例(61.1%)に、網膜過誤腫を6/17例(35.3%)に認めた。中枢神経症状では、中等度以上の知的発達症を12/21例(57.1%)に、ASDを8/17例(47.1%)に、ADHDを3/18例(16.7%)に認めた。頭部MRIでは、SEGAを3/20例(15.0%)に、脳回形成異常を2/20例(10.0%)に認めた。活動性てんかんは、9/21例(42.9%)に認めた。

Tab. 1に測定したmiRNA値と年齢との相関を示す。has-miR30-5pおよびhas-miR188-3pはすべての検体で測定感度以下であったため、以降の解析から除外した。残りの4つのmiRNAの測定値はいずれも性差はなく、年齢との有意な相関も認めなかった。

Tab. 2からTab. 5に各miRNA値とTSCの症状の有無との関係を示す。hsa-miR21-5p値はFSの既往および心横紋筋腫ありで有意に低値、網膜過誤腫および活動性てんかんありで低値の傾向であった。hsa-miR22-3p値は、FSの既往および心横紋筋腫ありで低値の傾向を示した。hsa-miR23-3p値は、心横紋筋腫ありで有意に低値、SEGAありで高値の傾向を示した。hsa-miR27a-3p値は、心横紋筋腫ありで有意に低値、網膜過誤腫ありで低値の傾向を示した。一方、中等度知的発達症・ASD・ADHDの有無で有意差を認めるmiRNAはなかった。

考察

本研究では、心横紋筋腫ありは検討できた4つのmiRNAのうち3つのmiRNAで有意に低値、1つのmiRNAで低値の傾向を示した。またFSの既往ありは1つのmiRNAで有意に低値、他の

1つのmiRNAで低値の傾向を示した。網膜過誤腫ありは2つのmiRNAで低値の傾向を示した。活動性てんかんありは1つのmiRNAで低値の傾向を、SEGAありは1つのmiRNAで高値の傾向を示した。これらの結果から、心横紋筋腫や網膜過誤腫のような腫瘍性の病変を持つ症例ではmiRNAのdown regulationが起きている可能性が示唆された。一方、中枢神経症状ではFSの既往や活動性てんかんとmiRNAの発現に関連がある可能性は窺われたが、堅固な所見ではないと思われた。また、ASDやADHDなどのTANDとmiRNAには相関がなく、今回検討したmiRNAはTANDのバイオマーカーとしては有用ではないと思われた。その原因として、TANDではその病態は主に中枢神経系に限局しており、末梢血中のmiRNAにはその変化が反映されないことが推測される。

TSCにおけるmiRNAの研究は様々な観点から行われている¹⁻¹⁰⁾。Trelinskaらは、10例のTSC症例においてエベロリムス投与前と投与3か月後、および10例の年齢と性をマッチさせた健常対照10例において752種のmiRNAを測定した¹⁾。その結果、対照群と比べてTSC症例では4つのmiRNAがdownregulate、7つのmiRNAがupregulateされていた。そのうち7つのmiRNAがエベロリムス投与で正常化した。著者らは、miRNAのdysregulationがTSCの病態と関与しており、mTOR阻害薬の効果はmiRNAプロファイルの変化とリンクしていると結論付けている。Scheperらは、EPISTOPプロジェクト対象症例の研究参加時の検体を用いて網羅的なmiRNAおよびアイソフォーム(isomiR)の解析を行い、ASDや知的発達症を含

Tab. 2 hsa-miR21-5p値とTSCの症状

	あり		なし		P 値
男児	N=10	1.6 (0.93-2.98)	N=11	1.30 (0.66-3.97)	0.512
FS の既往	N=6	0.95 (0.66-1.64)	N=15	1.63 (0.93-3.97)	0.0184
顔面血管線維腫	N=13	1.63 (0.66-3.97)	N=6	1.30 (0.82-3.47)	0.701
心横紋筋腫	N=11	1.22 (0.66-2.98)	N=7	2.09 (0.93-3.97)	0.0441
腎血管筋脂肪腫	N=11	1.44 (0.66-3.52)	N=7	1.87 (0.82-3.47)	0.425
網膜過誤腫	N=6	1.05 (0.66-2.98)	N=11	1.63 (0.93-3.97)	0.0983
中等度以上 ID	N=12	1.34 (0.66-3.52)	N=9	1.57 (0.82-3.97)	0.808
ASD	N=8	1.54 (0.85-3.52)	N=9	1.57 (0.66-3.97)	0.743
ADHD	N=3	1.44 (1.22-2.09)	N=15	1.57 (0.66-3.97)	0.824
SEGA	N=3	3.47 (1.06-3.52)	N=17	1.44 (0.66-3.97)	0.216
脳回形成異常	N=2	2.48 (1.44-3.52)	N=18	1.44 (0.66-3.97)	0.379
活動性てんかん	N=9	1.22 (0.66-2.09)	N=12	1.76 (0.82-3.97)	0.0815

FS:熱性発作、ID:知的発達症、ASD:自閉スペクトラム症、ADHD:注意欠如・多動症、SEGA:上衣下巨細胞性星細胞腫

Tab. 3 hsa-miR22-3p値とTSCの症状

	あり		なし		P 値
男児	N=10	1.26 (0.50-4.59)	N=11	1.06 (0.43-1.89)	0.173
FS の既往	N=6	0.80 (0.43-1.45)	N=15	1.22 (0.50-4.59)	0.0548
顔面血管線維腫	N=13	1.41 (0.43-4.59)	N=6	1.07 (0.63-1.55)	0.323
心横紋筋腫	N=11	1.22 (0.43-4.59)	N=7	1.41 (0.50-1.88)	0.0791
腎血管筋脂肪腫	N=11	1.41 (0.43-4.59)	N=7	1.13 (0.63-1.55)	0.659
網膜過誤腫	N=6	1.00 (0.43-2.65)	N=11	1.41 (0.50-4.59)	0.149
中等度以上 ID	N=12	1.10 (0.43-4.59)	N=9	1.41 (0.50-2.33)	0.917
ASD	N=8	1.22 (0.85-2.65)	N=9	1.41 (0.43-4.59)	0.888
ADHD	N=3	1.41 (1.06-1.55)	N=15	1.13 (0.43-4.59)	0.912
SEGA	N=3	1.31 (1.08-1.88)	N=17	1.13 (0.43-4.59)	0.546
脳回形成異常	N=2	1.64 (1.41-1.88)	N=18	1.11 (0.43-4.59)	0.316
活動性てんかん	N=9	1.06 (0.43-1.55)	N=12	1.33(0.50-4.59)	0.148

FS:熱性発作、ID:知的発達症、ASD:自閉スペクトラム症、ADHD:注意欠如・多動症、SEGA:上衣下巨細胞性星細胞腫

むTANDとの関連を検討した²⁾。TSC症例では1765のmiRNAと18741のisomiRの発現が確認され、情報生命科学的な解析によってTANDとの関連を解析したところ、いくつかのmiRNAやisomiRがTAND発症と関連しており、それらを組み合わせたパネルを用いるとさらに予測

精度が改善することを示した。Korotkovらは、TSC症例から外科的に切除した37個の皮質結節と剖検で得た対照組織におけるmiR-34aの発現を比較し、miR-34aが胎児期～出生後早期に皮質結節で過剰発現し、特に巨細胞や異形ニューロンの存在と関連していることを示した³⁾。

Tab. 4 hsa-miR23a-3p値とTSCの症状

	あり		なし		P 値
男児	N=10	1.95 (0.83-4.69)	N=11	1.28 (0.63-9.21)	0.973
FS の既往	N=6	1.26 (0.99-1.89)	N=15	2.38 (0.63-9.21)	0.34
顔面血管線維腫	N=13	2.01 (0.63-9.21)	N=6	1.54 (0.99-5.19)	0.898
心横紋筋腫	N=11	1.15 (0.63-4.69)	N=7	3.24 (0.93-9.21)	0.0269
腎血管筋脂肪腫	N=11	1.23 (0.63-4.86)	N=7	2.01 (0.99-5.19)	0.425
網膜過誤腫	N=6	1.13 (0.63-4.69)	N=11	2.81 (0.83-9.21)	0.216
中等度以上 ID	N=12	1.24 (0.63-4.86)	N=9	2.38 (0.93-9.21)	0.345
ASD	N=8	2.35 (0.63-4.86)	N=9	1.57 (0.83-9.21)	0.815
ADHD	N=3	2.38 (1.05-2.82)	N=15	1.57 (0.63-9.21)	0.999
SEGA	N=3	4.86 (1.89-5.19)	N=17	1.28 (0.63-9.21)	0.093
脳回形成異常	N=2	3.62 (2.38-4.86)	N=18	1.43 (0.63-9.21)	0.263
活動性てんかん	N=9	1.19 (0.63-2.82)	N=12	2.42 (0.83-9.21)	0.148

FS:熱性発作、ID:知的発達症、ASD:自閉スペクトラム症、ADHD:注意欠如・多動症、SEGA:上衣下巨細胞性星細胞腫

Tab. 5 hsa-miR27a-3p値とTSCの症状

	あり		なし		P 値
男児	N=10	1.16 (0.47-3.69)	N=11	1.41 (0.23-16.6)	0.918
FS の既往	N=6	1.09 (0.51-2.00)	N=15	1.49 (0.23-16.6)	0.34
顔面血管線維腫	N=13	1.41 (0.23-16.6)	N=6	1.06 (0.51-7.62)	0.831
心横紋筋腫	N=11	0.92 (0.23-3.69)	N=7	2.76 (1.02-16.6)	0.0083
腎血管筋脂肪腫	N=11	1.02 (0.23-3.69)	N=7	1.31 (0.51-7.62)	0.479
網膜過誤腫	N=6	0.73 (0.23-3.69)	N=11	1.73 (0.47-16.6)	0.0782
中等度以上 ID	N=12	0.97 (0.23-3.69)	N=9	1.73 (0.51-16.6)	0.169
ASD	N=8	1.40 (0.23-3.69)	N=9	1.41 (0.47-16.6)	0.999
ADHD	N=3	1.73 (0.78-2.76)	N=15	1.31 (0.23-16.6)	0.824
SEGA	N=3	1.49 (1.31-7.62)	N=17	1.02 (0.23-16.6)	0.358
脳回形成異常	N=2	1.61 (1.49-1.73)	N=18	1.16 (0.23-16.6)	0.674
活動性てんかん	N=9	0.92 (0.23-2.76)	N=12	1.45 (0.47-16.6)	0.247

FS:熱性発作、ID:知的発達症、ASD:自閉スペクトラム症、ADHD:注意欠如・多動症、SEGA:上衣下巨細胞性星細胞腫

また、ラットを用いた実験を行い、miR-34aはmTORC1の抑制に働くが、一方でTSCの皮質形成の異常にも関与していることを示した。Cukovicらは、外科的に切除したTSC症例の皮質結節から分離したエクソソーム中のmiRNAカーゴを解析し、てんかん原性をもつ皮質結節

と持たない皮質結節との間で比較した⁴⁾。著者らは12種のmiRNAがてんかん原性をもつ皮質結節で有意に増加しており、toll-like receptorを活性化する核酸モチーフを含んでいることを示した。さらにてんかん原生を持つ皮質結節から分離したエクソソームが、培養細胞において

複数の炎症の経路を活性化することを提示し、炎症がてんかんの難治化に関与している可能性がある」と述べている。このように、TSCにおけるてんかんやTANDは様々なmiRNAと関連している可能性が窺われるが、現時点では研究方法や解析結果が報告者によって異なっており、明瞭な結論は得られていない。miRNAがTSCにおけるてんかんやTANDのバイオマーカーとして有用であることが期待されるが、膨大な数のmiRNAの意義を明らかにするには先進的な解析方法を用いるなどの工夫が必要であると思われる。

本研究の限界としては以下の点が挙げられる。まず、症例数が十分ではなく、検出力に限界があった可能性がある。TSCは稀少疾患であるため、多数の症例を集積するのは容易ではない。十分な症例を集めるには全国規模の他施設共同研究が必要であろう。症例の年齢や重症度の幅が広いことも、検出力に影響を与えた可能性がある。EPISTOPのような均一な条件での検討が望ましい。また、本研究では候補miRNAを解析しており、網羅的な解析を施行しなかった。現在までに極めて多数のmiRNAが知られており、網羅的解析を行うことで新たな知見が得られる可能性はある。本研究では正常対照を用いていない。正常対照や他疾患との比較研究も施行するとmiRNAの意義がより明確になる可能性がある。

謝辞

本研究を行うにあたり研究助成を頂きました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Trelinska J, Fendler W, Dachowska I, Kotulska K, Jozwiak S, Antosik K, et al. Abnormal serum microRNA profiles in tuberous sclerosis are normalized during treatment with everolimus : possible clinical implications. *Orphanet J Rare Dis* 2016 ; **11** : 129.
- 2) Scheper M, Romagnolo A, Besharat ZM, Iyer AM, Moavero R, Hertzberg C, et al. miRNAs and isomiRs : Serum-based biomarkers for the development of intellectual disability and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex. *Biomedicines* 2022 ; **10** : 1838.
- 3) Korotkov A, Sim NS, Luinenburg MJ, Anink JJ, van Scheppingen J, Zimmer TS, et al. MicroRNA-34a activation in tuberous sclerosis complex during early brain development may lead to impaired corticogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2021 ; **47** : 796-811.
- 4) Cukovic D, Bagla S, Ukasik D, Stemmer PM, Jena BP, Naik AR, et al. Exosomes in epilepsy of tuberous sclerosis complex : Carriers of pro-inflammatory microRNAs. *Noncoding RNA* 2021 ; **7** : 40.
- 5) Broekaart DWM, van Scheppingen J, Anink JJ, Wierds L, van Het Hof B, Jansen FE, et al. Increased matrix metalloproteinases expression in tuberous sclerosis complex : modulation by microRNA 146a and 147b in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2020 ; **46** : 142-159.
- 6) Pawlik B, Smyczyńska U, Grabia S, Fendler W, Drózd I, Bąbol-Pokora K, et al. mTOR inhibitor treatment in patients with tuberous sclerosis complex is associated with specific changes in microRNA serum profile. *J Clin Med* 2022 ; **11** : 3395.
- 7) Bongaarts A, de Jong JM, Broekaart DWM, van Scheppingen J, Anink JJ, Mijnsbergen C, et al. Dysregulation of the MMP/TIMP proteolytic system in subependymal giant cell astrocytomas in patients with tuberous sclerosis complex : Modulation of MMP by microRNA-320d in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 2020 ; **79** : 777-790.
- 8) Kuzniewska B, Sadowski K, Urbanska K, Urbanska M, Kotulska K, Liszewska E, et al. The level of microRNA 21 is upregulated by rapamycin in serum of tuberous sclerosis complex patients and subependymal giant cell astrocytoma (SEGA)-derived cell cultures. *Folia Neuropathol* 2018 ; **56** : 167-174.
- 9) Zhao Y, Guo H, Wang W, Zheng G, Wang Z,

Wang X, et al. High-throughput screening of circRNAs reveals novel mechanisms of tuberous sclerosis complex-related renal angiomyolipoma. *Hum Genomics* 2021 ; **15** : 43.

- 10) Pawlik B, Grabia S, Smyczyńska U, Fendler W, Drózd I, Liszewska E, et al. MicroRNA expression profile in TSC cell lines and the impact of mTOR inhibitor. *Int J Mol Sci* 2022 ; **23** : 14493.

