

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19405

研究課題名(和文) 閉塞性肺疾患の重症化に関わるエクソソームmicroRNAの同定と臨床応用

研究課題名(英文) Identification of exosomal microRNA associated with severe obstructive lung diseases and its clinical application

研究代表者

鈴木 雅 (Suzuki, Masaru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10374290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性喘息患者では健常者および軽症・中等症喘息患者に比較して血清エクソソームRNAのプロファイルが変化していた。microRNAの解析では難治性喘息患者において有意に上昇している4つのmicroRNAを同定し、パスウェイ解析ではErbB signaling pathwayやNeurotrophin signaling pathwayがそれらにより制御されるものとして同定された。

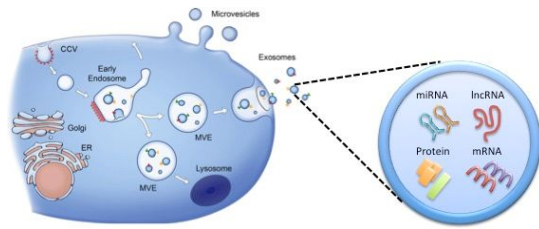
研究成果の概要(英文)：Serum exosomal RNA profiles were altered in patients with severe asthma compared with healthy volunteers and patients with mild-to-moderate asthma. MicroRNA analysis revealed that four microRNAs were significantly up-regulated in patients with severe asthma, and pathway analysis identified ErbB signaling pathway and Neurotrophin signaling pathway as top-ranked pathways regulated by the up-regulated microRNAs.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：エクソソーム microRNA 難治性喘息

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは生体内で細胞から分泌される直径 30~100 nm 程度の脂質二重膜の小胞であるが、近年、エクソソームには様々な蛋白質や核酸が含まれていることが報告されている。特に多くの遺伝子や蛋白発現制御に関与している microRNA が内包されていることが示され(Valadi H, et al. Nat Cell Biol 2007)、これまで細胞内でのみ働くと考えられてきた microRNA が細胞外へ分泌され、細胞間の情報伝達を担う重要な働きがあることが示された。そして、そのプロファイルを解析することで非侵襲的なバイオマーカーとなりうることを期待されている。



一方で慢性呼吸器疾患の代表である慢性閉塞性肺疾患(COPD)や気管支喘息患者の中には重症化・難治化に至る症例も存在し臨床で大きな問題となる。COPDでは呼吸機能が急速に低下していく群が存在し、また増悪を頻回に生ずる患者群も存在する。さらに気管支喘息では、経口ステロイドや抗IgE抗体を除く治療を行っても症状が持続する最重症型の難治性喘息患者が存在し、呼吸器内科診療で大きな問題となっている。しかしながらこれらの重症化・難治化に至るメカニズムは未だ不明であり、また予測することも困難である。

2. 研究の目的

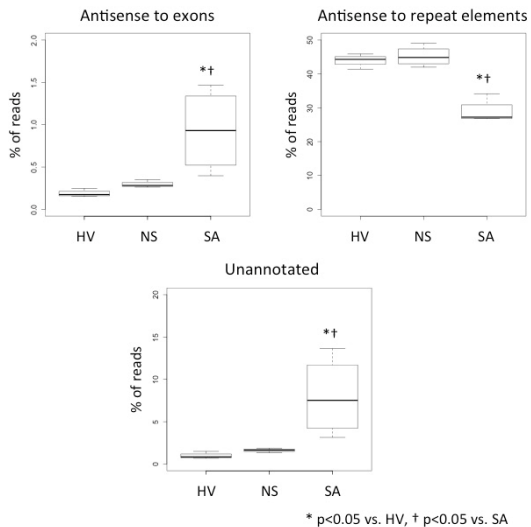
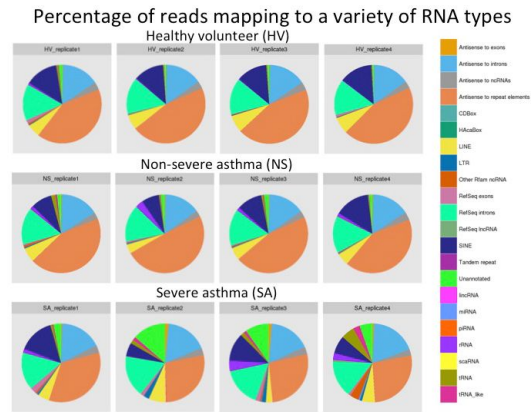
血中や喀痰中に存在するエクソソーム中の microRNA を網羅的に解析することで、閉塞性肺疾患の重症化・難治化に至る要因を探るとともに、個別化医療につながるバイオマーカーを確立する。

3. 研究の方法

北海道難治性喘息コホートに参加している気管支喘息患者のうち、難治性喘息4名と軽症・中等症喘息4名、さらに健常者4名の血清よりエクソソーム分画のみを分離採取後に RNA を抽出し、次世代シーケンサー(Illumina)にて RNA シークエンシングを施行した。これらの解析は System Biosciences 社の the Exosome RNA Next-Gen Sequencing Service にて行った。データ解析は Marverix Biomix 社の Marverix Analytic Platform を用い、主成分分析は R ソフトウェア、パスウェイ分析は DIANA-mirPath を用いて施行した。

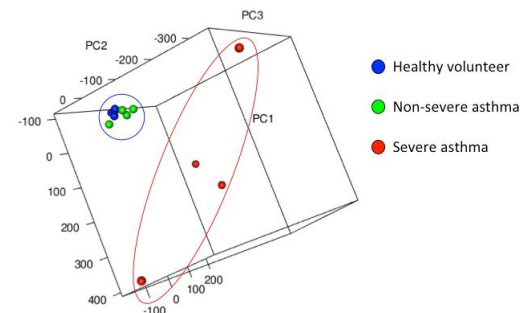
4. 研究成果

血清エクソソーム RNA の次世代シーケンサー分析の結果、難治性喘息群では他群と比較して antisense to repeat elements の現象や antisense to exons と unannotated RNA の増加が認められるなど、末梢血エクソソーム内の RNA プロファイリングが変化していることが示された(下図)。



主成分分析では、難治性喘息群が他群と明らかに異なる末梢血エクソソーム内の RNA プロファイリングを有することが示唆された(下図)。

Principle component analysis of all reads

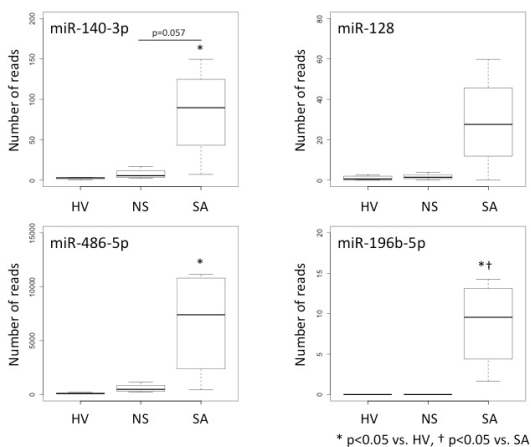


microRNA の解析では、難治性喘息群において miR-128、miR-140-3p、miR-196b-5p および miR-486-5p が他群に比較して有意に上昇していた（下表、下図）。

難治性喘息で高発現していた microRNA

microRNA ID	HV+NS (mean)	SA (mean)	log2 fold change	p value	FDR q value
hsa-miR-140-3p	4.99	84.02	4.0731	0.0003	0.038
hsa-miR-128	1.35	28.77	4.4083	0.001	0.1045
hsa-miR-486-5p	341.5	6588.61	4.27	0.001	0.1146
hsa-miR-196b-5p	0	8.76	Infinity	0.003	0.1814

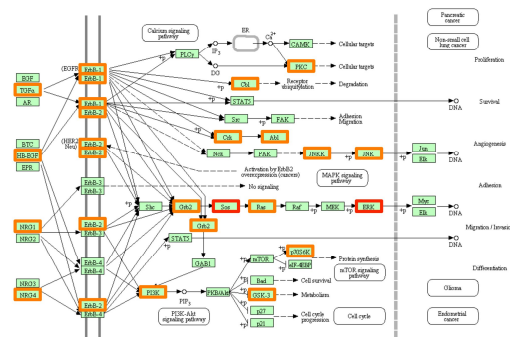
HV = healthy volunteer
NS = non-severe asthma
SA = severe asthma



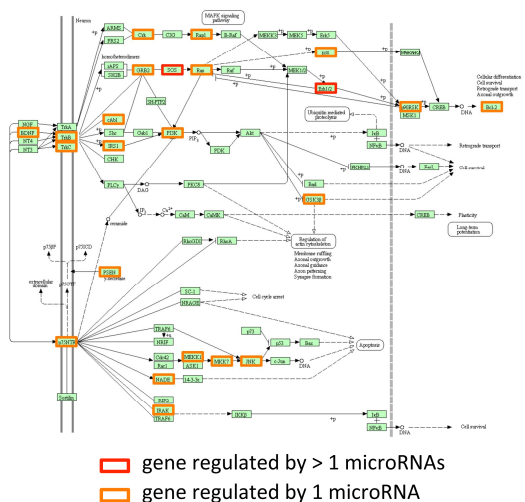
DIANA-mirPath によるパスウェイ分析では、ErbB signaling pathway, focal adhesion, Neurotrophin signaling pathway 等が、上記4つのmicroRNAにより制御されうるものとして同定された。

KEGG pathway	p value	#genes	#miRNAs
ErbB signaling pathway	3.59e-14	24	4
Focal adhesion	4.62e-13	42	4
Neurotrophin signaling pathway	7.92e-07	25	4
mTOR signaling pathway	5.88e-06	15	3
PI3K-Akt signaling pathway	5.88e-06	49	4
Insulin signaling pathway	5.88e-06	25	4
Prostate cancer	5.88e-06	19	4
Endometrial cancer	2.01e-05	13	4
Other types of O-glycan biosynthesis	7.60e-05	6	4
MAPK signaling pathway	8.88e-05	39	4

ErbB signaling pathway



Neurotrophin signaling pathway



なお、最終年度において上記の知見を検証すべく、別の難治性喘息4名、軽症・中等症喘息4名、健常者4名より同様の解析を施行したが、うち数検体のエクソソーム RNA の品質が極端に低下しており、次世代シーケンスによる解析が不可能な状況であった。今後、さらに新たな検体を用いて RNA シークエンシングの結果を検証していく予定としている。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

Masaru Suzuki, Satoshi Konno, Hironi Makita, Kaoruko Shimizu, Hiroki Kimura, Hirokazu Kimura, Masaharu Nishimura. Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. 第57回日本呼吸器学会学術講演会、2017.4.21、東京国際フォーラム（東京都・千代田区）

Masaru Suzuki, Satoshi Konno, Hironi Makita, Kaoruko Shimizu, Hiroki Kimura, Hirokazu Kimura, Masaharu Nishimura. Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. The 26th European Respiratory Society Annual Congress, 2016.9.6, ExCeL London (London, UK)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 雅 (SUZUKI, Masaru)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10374290

(2)研究分担者

なし