

令和元年6月13日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09037

研究課題名(和文) 潜在性結核感染症と発病期におけるmiRNA探索と免疫制御における役割

研究課題名(英文) Identification biomarker of small RNA and its physiological and pathological role in immune response to Tuberculosis and latent TB infection

研究代表者

趙虹(Zhao, Hong)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：10596183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：潜在性結核感染症(LTBI)患者が結核発症に至る群に特徴的な何らかのバイオマーカーを見出すことは今後の治療戦略を決定する上で大きな意味がある。この研究では、患者血清中のエクソソームに含まれるmiRNAを解析し、LTBI患者、結核発症患者に特有なバイオマーカーを探索している。2017年度に、血清エクソソーム中のmiRNAを次世代シーケンサーで解析を行ない、LTBI患者群で発現が低く、結核発症患者群で発現の高いmiRNAが二つ見出したことから、2018年度には、グループ間の性別、年齢分布の偏りを補正するため、症例を増やし検討を重ねることで、解析結果の精度を高められるよう進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAの簡易なより検出法が整うことで、潜在性結核感染症、活動性、治療の必要性の判定、治療効果の判定への応用を期待している。結核発症患者を効果的に減少させる方策の一部になりうることから、公衆衛生的にも貢献しうるものである。

研究成果の概要(英文)：LTBI is defined as a state of persistent immune response to stimulation by Mycobacterium tuberculosis antigens without evidence of clinically manifested active TB. Around 10-20% LTBI progress to active TB. So it is very important to find out specific bio marker for LTB, which will provide improved therapeutic strategies for the treatment of TB. In our study, we analyzed miRNA profiles of serum exosomes derived from LTBI and TB patients. Preliminary data showed that differential miRNA expression profiles among the serum exosomes from LTBI, and TB groups. To correct bias in age distribution, samples were newly collected and added to LTB and TB each group. It is expected that through second next-generation sequencing analysis and in vitro assay, we could confirm and identify specific miRNA as a biomarker that expressed in LTB or in TB, which will contribute to potential molecular targets for detection/diagnosis of latent and active tuberculosis.

研究分野：免疫

キーワード：結核感染症 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AIDS、マラリア、結核などは病原体が体に長い潜在期を経て発症する。長期間に渡って感染から発病までを実験動物で研究することは困難である。申請者の趙は、マラリアの感染成立に関して動物モデルを用いて研究を行ってきた(Zhao ら, Cell Host and Microbe 2014, Zhao ら, Cell Host Microbe 2012.)。ヒトの感染症では、世界人口の約3分の1ともいわれる結核菌感染症はなお大きな問題である。結核発病患者をより少なくするための対策としては、より効果的なワクチンの開発と潜在性結核感染者を早期に発見し発病を抑えることが重要であろう。本研究は、結核高まん延地域を抱える大阪における結核対策をさらに進めるため、実地レベルと学際レベルでの幅広い協力関係を構築しながら、新たな「結核対策大阪モデル」を作ろうと多施設から参集する結核勉強会メンバーが行う前向きコホート研究の一部である。全体のプログラムは、「あいりん地域の医療施設・ケア施設および結核医療施設の職員におけるクオンティフェロン-TB 3G (QFT) 検査を用いた潜在性結核感染症 (LTBI) の効果的な診断およびその効果的な治療指針の確立に関する研究」であり、3年間に渡り延べ5000人以上のQFT検査受診者から、QFT陽性者を見出し、コホート研究への参加を求めている。結核菌は感染初期においては、まず肺胞マクロファージによって貪食されるが、II型肺胞上皮細胞に感染する。自然免疫系およびTH1の獲得免疫系が生体防御機構として働く。マクロファージや樹状細胞はマイクロRNA(miRNA)を含むエクソソームを多く分泌する。今回バイオマーカーとして探索するものは、血清中に分泌されたエクソソーム中のmiRNAである。エクソソームは直径100nm程度の脂質二重膜を持った小粒子で細胞から放出され、血液、汗、尿、髄液など体液中に存在している。エクソソームはmiRNAなどを介し細胞間情報伝達に関与している。申請者のうち村上らはHBV、HCV感染特異的に、また、肝線維化、炎症、脂肪化の程度別に、エクソソーム中のmiRNA発現プロファイルを作成して報告した(Yamamoto ら Biomarker 2009, Shigoka ら Pathology Int 2010, Murakami ら, PLoS ONE 2012)。またエクソソーム表面に抗原を表出させると標的細胞特異的にmiRNAをデリバリーできることも報告されている(Itami ら Mol Therapy 2012)。これまでに自然免疫に機能するmicroRNAとして、サイトカイン産生細胞にLPS刺激に応じて発現するmicroRNAが見いだされているが自然免疫における機能は不明である。

2. 研究の目的

潜在性結核感染症(LTBI)患者の1-2割は2年以内に発病する。LTBI患者の早期発見とLTBIから発病に至る過程に特徴的なバイオマーカーの発見が重要である。申請者らの大阪結核研究グループは、あいりん地域やその周辺の医療従事者を数年にわたり、クオンティフェロン-TB3G(QFT)検査を行い、その陽性者を対象にコホート研究を計画している。研究目的は、1)血清エクソソーム中のmiRNA発現パターンを検討し、LTBI期、LTBIから発病に至る時期、QFT陽性かつ発病の確認された時期それぞれに特徴的なマイクロRNA(miRNA)を見出すこと、2)それぞれのmiRNAの分泌細胞の同定、抗原提示細胞や活性化T細胞に対する作用を検討し、miRNAによる潜在性感染症から発病への関与の一端を解明し、かつバイオマーカーとしての用性を明らかにすることである

3. 研究の方法

.QFT陽性で前向きコホート研究参加の人の血清よりエクソソーム分画を回収し、含まれるmiRNAを網羅的に知るためマイクロアレイで解析する。健常者群も別に集め、次項に示すグル

ープ分けを行い、miRNA バイオマーカープロファイルを作成し、潜在性結核感染症(LTBI)と発病期の指標となる miRNA バイオマーカーを同定する。LTBI 時期に結核発病予防治療を行った群での miRNA 変化にも注目する。

4. 研究成果

結核感染を受けても発症に至らない潜在性結核感染症(LTBI)患者の1-2割は2年以内に発病するとされている。本邦では、未だLTBIとされただけで治療の対象とはなっていないことから、多数のLTBI患者群をコホート研究することで、実際に発症に至る群に特徴的な何らかのバイオマーカーを見出すことは今後の治療戦略を決定する上で大きな意味がある。この研究では、患者血清中のエクソソームに含まれるmiRNAを解析し、LTBI患者、結核発症患者に特有なバイオマーカーを探索している。コホートに入るLTBI患者を未治療のまま発症まで統計的解析が可能なほど多数追跡することは困難であることから、大阪はびきの医療センターにて入院治療を受けることになった結核患者群、外来にてLTBIと判明し、LTBIの治療を行う予定の群でコホートを開始している。2017年度に、LTBIで治療前の症例10例、結核発症患者10例の血清エクソソーム中のmiRNAを次世代シーケンサーで解析を行ない、LTBI患者群で発現が低く、結核発症患者群で発現の高いmiRNAが二つ見出したことから、2018年度には、グループ間の性別、年齢分布の偏りを補正するため、症例を増やし検討を重ねることで、解析結果の精度を高められるよう進めている。今年度は、LTBI群と結核発症患者群に含める症例の年齢分布が揃うよう、新たにそれぞれ6症例ずつサンプル数を増やし、LTBI症例に特徴的なmiRNA、結核発症症例に特徴的なmiRNAを見出すことを期待してNGSシーケンス法での解析を行なっているところである。データを得る段階で一部問題が起こり、現時点では再度のデータ収集を行なっている。データが得られ次第、解析を終了し、残りの症例などを含めてRT-PCR法を用いて結果の再確認を行う予定である。

<引用文献>

Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda H, Shimizu M, Kohyama M, Koyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmin H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshichika Y, Ishii K, Coban C. Olfactory Plays a Key Role in Spatiotemporal Pathogenesis of Cerebral Malaria. *Cell Host and Microbe* 2014, 15(5):551- 563. (査読あり)

Y-h Taguchi, Murakami Y. Principal component analysis based feature extraction approach to identify circulating microRNA Biomarkers. *PLoS ONE* 2013; 8:e66714. (査読あり)

Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, and Y-h Taguchi. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS ONE*. 2012; 7: e48366 (査読あり)

Zhao H, Konishi A, Yukiko F, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii K J, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe* 12(5):705-16.2012 (査読あり)

Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int*. 2010; 60: 351-357 (査読あり)

Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers. 2009; 14: 529-38. (査読あり)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村上 善基
ローマ字氏名： MURAKAMI Yoshiki
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：医学系研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：00397556

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：中嶋 弘一
ローマ字氏名： NAKAJIMA Koichi
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：医学系研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：00227787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。