

令和 2 年 7 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：2017～2019

課題番号：17K08984

研究課題名(和文)エクソソーム内microRNAを用いた非アルコール性脂肪性肝疾患の予後予測法開発

研究課題名(英文)Development of a method to predict the severity of nonalcoholic fatty liver disease by exosomal microRNA

研究代表者

米山 弘人(Yoneyama, Hirohito)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80294750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：NAFLDの予後予測に有用なバイオマーカーを同定する目的で患者血清からエクソソームマイクロRNA(exo-miRNA)を抽出し、数千種のmiRNA搭載オリゴチップにかけて網羅的解析を行った。その結果NASH発症と相関するexo-miRNAが複数同定出来た。しかしこれらをRT-PCRで定量、NAFLD重症度との相関性を検証した所いずれも有意な相関を示さなかった。原因を分析すると、患者の体組成プロフィールがヘテロである事が判明した。体組成はNASH発症進展に深く関わる事が推測されている。そこで現在、体組成型別にexo-miRNAを比較解析しNASH発症に関わるexo-miRNAを同定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH/NAFLD 研究を困難にしている最大要因の1つは患者背景の多様性であるが、今回の研究成果から血清エクソソームマイクロRNA(exo-miRNA)解析と体組成計測の2つが多様な患者背景を重症化予測の観点から明確に分類できる可能性が示唆された。本研究の更なる進展が膨大なNAFLD患者から肝硬変・肝発がんに進展するNASHを効率的にスクリーニングする新たな診断技術開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of identifying biomarkers useful for prognosis of NAFLD, exosomal microRNA (exo-miRNA) was extracted from the serum of patients, and comprehensive analysis was carried out using oligo chips loaded with thousands of miRNAs. As a result, several exo-miRNAs that correlate with NASH development were identified. However, when these were quantified by RT-PCR and their correlation with NAFLD severity was examined, no significant correlation was shown. Analysis of the cause revealed that the patient's body composition profile was heterogeneous. It has been speculated that body composition is deeply involved in the development of NASH. Therefore, we are currently analyzing exo-miRNAs by body composition type to identify exo-miRNAs involved in NASH development.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 NAFLD 非アルコール性脂肪肝炎 NASH マイクロRNA 予後予測 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

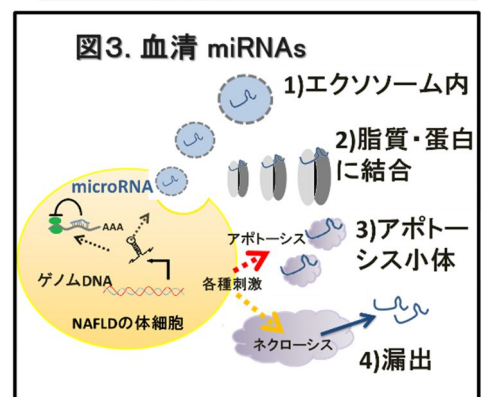
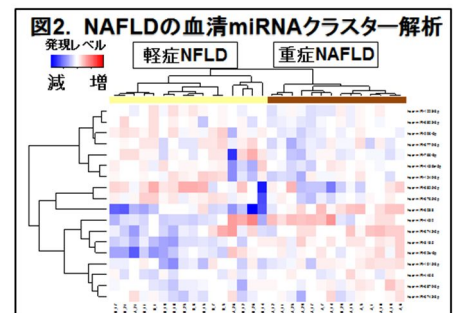
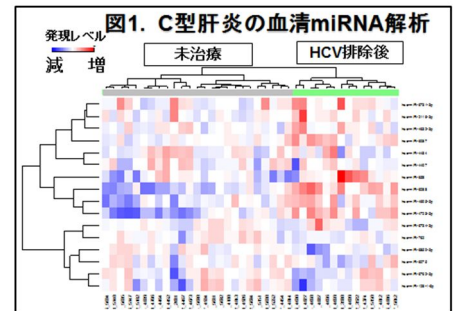
近年メタボリックシンドローム患者数が増加する中で、その1表現型のNAFLDおよび重症型である非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)の急増が懸念されている。日本のNASH頻度はNAFLDの10%未満だが、高率に肝線維化が進行し肝発癌率も高い深刻な病態である。優れた抗ウイルス剤の開発によりB型、C型肝炎の駆逐が急速に進みウイルス性肝発癌が減少する一方でNASHによる肝発癌は急速に増加している。ウイルス性肝炎が血清ウイルスマーカー、血小板数、血清AFP値、年齢などから肝発癌のハイリスク群を容易に絞りこみ、効率的なスクリーニングが可能であるのに対して、膨大な数のNAFLD患者からNASH発症、肝細胞癌発症のハイリスク群を絞り込む事は現在困難である。そのためNASH患者の多くが医療機関で適切にフォローされず、早期肝癌が見逃され、進行肝癌の段階で専門医へ紹介される例が後を絶たない。従ってNAFLDにおけるNASH発症および肝発癌の予測マーカーの開発は緊急の課題である。これまでに複数の予後予測因子が提案されているが簡便で効率的なバイオマーカーは未だ確立されていない。

miRNAは遺伝子の転写や翻訳を制御・調節する18~25塩基のnon-coding small RNAで血液中にも存在する。約2500分子存在するmiRNAは多くの細胞機能の根幹に関わり、癌を含む多種疾患の新規診断マーカーとして期待されている。当施設ではこれまで肝細胞癌、肝内胆管癌、C型肝炎など多種の消化器疾患でmiRNAの網羅的解析を行い(研究業績1・2・6・7・9)、各々の病態や治療との関連について検討を重ねてきた。当研究者は抗ウイルス治療を受けたC型肝炎患者においてHCV排除による肝炎鎮静化に伴い血中発現レベルが有意に変化するmiRNAを複数同定していたが(図1)、これらがNAFLD患者の重症度に応じて同様な発現変動を示すことを見出した。すなわち肝線維化や肝発癌のない軽症NAFLD群と線維化進展あるいは肝発癌した重症NAFLD群から夫々total RNAを抽出し、1719分子が搭載されたmiRNAアレイチップを用いて網羅的解析を行ったところ、NAFLDの重症化に応じて発現が有意に増強あるいは減弱するmiRNAが複数存在した(図2)。さらに重症NAFLD群で増強するmiRNAと未治療C型肝炎患者に発現が高いmiRNAの多くが一致し、軽症NAFLD群で発現が高いmiRNAはHCV排除後のC型肝炎患者に増強するmiRNAと一致していた。HCV排除による肝炎沈静化は肝線維化改善および肝発癌抑制効果が非常に高い事が既に証明されている事から、上記の予備的研究結果は血清中のmiRNAがNAFLD患者の重症度に密接に関与し、肝線維化や肝発癌を予測するバイオマーカーと成り得る可能性を示唆するものと言える。

しかし予備研究ではmiRNAを血清全体で測定している。血清miRNAは図3の様に複数の存在形式があり、病態と密接に関連するのは1)のエクソソーム内miRNAである。従ってバイオマーカーとしての感度と特異度を上げるためにはmiRNAをエクソソームで解析する必要がある。あらゆる細胞が分泌するエクソソームは蛋白質、mRNA、DNA、ペプチド等様々な物質を内包し、細胞・組織間で遺伝子発現情報を伝搬するデリバリーカーゴである。miRNAもエクソソーム内に存在し、細胞間伝搬して様々な病態を引き起こす事実は最近示されたばかりで、疾病診断・治療への応用が期待されつつも未開拓の分野である。本研究者は前述のmiRNA(NAFLD重症度関連)がエクソソームに高濃度存在する予備実験データを既に掴んでいる。エクソソームは一定期間全身の体液中を循環し、疾患特異的な物質を標的細胞へ運び続ける。従ってNAFLD患者血清から抽出したエクソソームでmiRNAを解析し病態、臨床経過との関連性を検証することで、予後予測のための非常に優れたバイオマーカー確立、さらに治療標的分子への応用も期待できる。

2. 研究の目的

多くの細胞機能や病態生理に深く関わり、血液中にも存在し多疾患の新規診断バイオマーカーとして期待されているが、NASH研究の分野ではまだまだあまり研究されていないマイクロRNA(miRNA)に着目し、非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)患者の血清中のmiRNAを網羅的に解析して病態や臨床経過との関連性があるmiRNAを同定する。ピックアップされたmiRNA(特にエクソソーム中のmiRNA)について個々のNAFLD患者での発現量の増減パターンを解析することで本疾患の予後予測についての診断アルゴリズム作成を試みる。NAFLDの重症化予測に有用なmiRNA分子種を同定し予後予測アルゴリズムを構築する。これらの検討により血清(特にエクソソーム)miRNAがNAFLD予後予測の画期的なバイオマーカーと成り得る事を証明する。またバイオマーカーとしての候補に挙げられたmiRNAの生物化学的特性を検討することで、NAFLDの重症型であるNASH(非アルコール性



脂肪肝炎)の治療標的分子への応用も目指す。

3. 研究の方法

(1) NAFLD 患者の血液に含まれるエクソソーム回収及びエクソソーム内 miRNA 抽出(図4): NAFLD 患者の末梢血液はおおよそ 30 例を目標として、外来または肝生検入院時の血液検査を施行する際に同時採取する。収集された血液から血清を分離して溶血のないことを確認し、PureExo エクソソーム単離キット(コスモ・バイオ)でエクソソーム溶液を分離した後、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)を使用して small RNA を含む total RNA として抽出する。精製試料中の RNA 品質は、Agilent 2100 バイオアナライザー(当講座で既に保有)で検証する。この RNA が小分子の RNA 領域に高いピークを示し、高分子領域のリポソーム RNA にピークバンドが検出できなければ、エクソソーム由来の RNA として保証できる。

エクソソーム内の miRNA についてのアレイを用いた網羅的解析): 上記 RNA サンプルを専用キットで蛍光標識し、2555 分子の miRNA を搭載したオリゴチップ(東レ、Human miRNA Oligo chip-4plex ver.21)にハイブリダイゼーションした後、アレイ用スキャナーでスキャンを行う。その後各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行い、シグナル値を算出しエクソソーム内の miRNA を同定する。

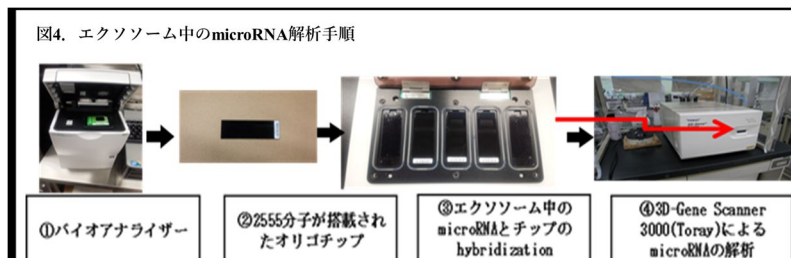
エクソソーム miRNA 発現プロファイルの解析): 発現プロファイルの解析は、計算解析サーバを使用し、従来の統計学的方法のみならずマイクロアレイに適した統計的手法 SAM (Significant Analysis of Microarray)、RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray)などを用いる。そして肝線維化のない症例(軽症 NAFLD 群)、線維化進展した症例(重症 NAFLD1 群)、肝発癌した症例(重症 NAFLD2 群)のグループ間において、エクソソーム中の miRNA 発現パターンが夫々独立したクラスターを形成するかどうかを確認する。

(2) 肝線維化進展や肝発癌に關するエクソソーム miRNA の同定とその標的遺伝子の予測: 軽症 NAFLD 群と重症 NAFLD1 群、重症 NAFLD2 群において、差異のみられたエクソソーム miRNA を同定し、それらの標的遺伝子予測を行う。その際、予測プログラムのデータベースである miRBase 及び Human micro RNA Targets を利用する。更に各群の臨床プロファイルとの相互関係について検討し、重症度判定に有用な miRNA の選別とそれを用いた NAFLD の予後予測アルゴリズムを各種解析ソフトを駆使して設計、作成する。

(3) NAFLD の病態や治療反応性に關連するエクソソーム内の miRNA の実験的検証実験: 100 名にスケールアップした NAFLD 患者の血清エクソソームについて、上記絞り込んだ miRNA サブセットを測定解析し、予後予測アルゴリズムを用いて NASH 発症、肝発癌の予後予測を行い実際の各症例の臨床プロファイルと照合解析する。臨床経過のフォロー期間が浅い症例については追跡調査の対象とし更に臨床プロファイル集積と予後予測検証を進める。

(4) NAFLD の病態や治療反応性に關連するエクソソーム内の miRNA の実験的検証実験: NAFLD 予後予測に有用と同定された miRNA をリポソーム法によりその合成 miRNA 前駆体分子 (Pre-miRMMRNA Precursor Molecules Ambion 社、本課題で申請)あるいは、miRNA 活性を上げる合成 miRNA 阻害分子 (Anti-miRNATM inhibitors Ambion 社、本課題で申請)を生成する。高脂肪食で飼育した C57BL/6N マウスに四塩化炭素 (CCl4)を皮下投与して NASH モデルマウス (=重症 NAFLD)を作成し、合成 miRNA 前駆体分子あるいは合成 miRNA 阻害分子を 2 週間経静脈的に投与する。投与前後の血清学的及び組織学的にみられる変化について検討を行う。また、肝線維化と関連が深いとされる TGF- β シグナル伝達の視点からも考察する。

最大のポイントは本研究で中心的に扱う患者血清のエクソソーム品質である。1 つは患者血清のエクソソーム濃度が薄い場合である。この場合は専用キットによるエクソソーム回収の際の遠心操作を数回繰り返し行って解析に耐えうるまでに収量を上げるか、それでもエクソソームの回収がうまくいかない場合には免疫沈降法などの他の手法によるエクソソームの検出を試みる。また抹消血液からのエクソソーム回収際して、溶血サンプルには血球由来のタンパク質や miRNA が多く混入している可能性があり解析結果に影響を及ぼすことが考えられるため、除外して検討を行う必要がある。従って予定より更に追加して症例を登録してサンプル回収、解析を行う必要が出てくる。



4. 研究成果

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者の予後予測に有用なバイオマーカーとしてのエクソソームマイクロ RNA(miRNA) を患者血清中に同定する目的で NAFLD 患者の保存血清から高品質のエクソソーム単離を行い、そこから miRNA を抽出し、2600 種の miRNA プローブを搭載したオリゴチップにかけて網羅的解析を行った。

臨床的プロファイルから軽症 NAFLD グループと、肝線維化が進んだ重症グループに分けて上記のエクソソーム miRNA の解析データについてクラスター解析を行ったところ両群間で miRNA 発現パターンに違いを認め、NAFLD の重症度すなわち肝線維化進展度や肝発がん有無と相関性を示す miRNA が複数同定出来た。

しかしこれらのエクソソーム miRNA を RT-PCR で定量し、NAFLD 重症度との相関性を検証したとこいづれも単独では統計的有意な相関性を示さなかった。その原因について検証した結果、軽症および重症 NAFLD のそれぞれのグループ内での体組成 (体組成計で測定した体脂肪や筋肉量の割合) に関するプロファイルがヘテロであることが判明した。体組成は NASH 発症進展に深く関わることが推測されているため、我々の解析も体組成により更に細かく分類した上で行う必要性があると考えられた。体組成で分類すると患者が 5 群に分類できることが判明した。

そこで各群毎に肝線維化進展例と非進展例でエクソソーム miRNA を比較解析しようとしたが統計的解析に必要な症例数がやや不足していたため現在更に症例を集積して解析を進めている。今後体組成の型ごとに NASH 発症、進展に関わるエクソソーム miRNA を同定、予測アルゴリズムを構築できると予想している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名	米山弘人、森下朝洋、谷丈二、野村貴子、坂本鉄平、藤田浩二、田所智子、大浦杏子、中原麻衣、琢磨慧、出口章広、樋本尚志、正木勉
2. 発表標題	生体電気インピーダンス法を用いた体組成計測によるNAFLD/NASHの肝線維化進展および治療効果予測
3. 学会等名	第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hirohito Yoneyama, Asahiro Morishita, Joji Tani, Takako Nomura, Teppei Sakamoto, Koji Fujita, Shima Mimura, Tomoko Tadokoro, Kyoko Oura, Mai Nakahara, Kei Takuma, Akihiro Deguchi, Takashi Himoto, Tsutomu MASAKI
2. 発表標題	Assessment of the progression of liver fibrosis by body comparison analysis by bioelectrical impedance analysis
3. 学会等名	APASL STC 2019 TOKYO (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Hirohito Yoneyama, Asahiro Morishita, Takako Nomura, Teppei Sakamoto, Koji Fujita, Shima, Mimura, Tomoko Tadokoro, Kyoko Oura, Mai Nakahara, Kei Takuma, Joji Tani, Akihiro Deguchi, Takashi Himoto, Tsutomu Masaki
2. 発表標題	Assessment of the progression of liver fibrosis by body comparison analysis by bioelectrical impedance analysis
3. 学会等名	The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (国際学会)
4. 発表年	2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	正木 勉 (Masaki Tsutomu) (30335848)	香川大学・医学部・教授 (16201)	