

令和元年6月5日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15609

研究課題名(和文) microRNAを標的とした非アルコール性脂肪肝炎に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for non-alcoholic steatohepatitis targeting microRNA

研究代表者

中村 昌人(Nakamura, Masato)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10756703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)におけるmicroRNA(miR)の関与を明らかにし、治療標的としての可能性を見出すことを目的とした。メチオニン・コリン欠乏食マウスおよびNASH患者の肝組織において、miR-200 familyの発現が有意に亢進していることを明らかにした。さらに、モデルマウスへのmiR-200b阻害剤投与が、肝逸脱酵素を低下させ、肝炎および肝線維化を抑制することを見出した。これにより、miR-200bが肝細胞死や肝炎症・肝線維化の制御を介してNASH発症に関与していること、その阻害がNASH治療法となり得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝硬変や肝癌の主要な原因となりつつある非アルコール性脂肪肝炎(NASH)において、細胞間情報伝達因子として注目されているmicroRNAの異常が関与していることを明らかにした。また、マウスモデルを用いて、microRNA制御がNASHの病態改善に有効であることを実証し、治療法が確立していないNASHの克服に新たな可能性を示した。本研究成果により、NASHに対する治療選択肢が増えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has becoming a leading cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide. In this study, we aimed to clarify the involvement of microRNAs (miRs) in NASH and to find out their potentials as therapeutic targets.

We revealed that expression of miR-200 family is significantly enhanced in liver tissues of mice fed with methionine-choline deficient diet. Upregulation of miR-200b expression also was observed in NASH patients, especially those with advanced liver fibrosis. Furthermore, it was found that miR-200b inhibitor administration to NASH model mice reduced liver damage and suppressed liver inflammation and fibrosis.

These data indicate that miR-200b is involved in the progression of NASH by affecting liver damage, inflammation and fibrosis, and that inhibition of miR-200b could be a novel treatment for NASH patients.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝硬変 microRNA

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

## 1. 研究開始当初の背景

先進諸国を中心として、肥満や糖尿病などの代謝性疾患の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) が増加している。NASH は、肝脂肪沈着を背景とした慢性炎症により肝線維化や肝発癌を来すと考えられ、肝硬変及び肝細胞癌の主要な原因となりつつある。しかし、NASH に対する薬物治療は確立しておらず、画期的な治療法の創出が早急の課題である。

近年、非コード低分子 RNA であり、多数の遺伝子発現を主に抑制的に制御する因子である microRNA (miR) と疾患との関連が注目されている。慢性肝疾患に関しては、miR-221、miR-27、miR-122 などと病態との関連が報告されている。C 型慢性肝炎に対しては、miR-122 阻害剤 (RNA 医薬品) の有用性が明らかとなっており、ヒトに対する臨床試験も実施されている。しかし、NASH においては、miR を標的とした治療薬として実用化されたものは無い。

そこで、NASH の病態、特に肝炎症制御に重要な microRNA の同定と作用機序の解明、さらには miR を標的とした治療薬候補の同定を着想した。

## 2. 研究の目的

肝硬変及び肝細胞癌の主要な原因の一つである NASH の病態規定因子を同定し、治療薬候補を見出すことを目的とした。特に、microRNA に着目し、その作用機序と発現制御による肝炎症・肝線維化抑制効果を明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

事前検討で、NASH モデルマウスであるメチオニン・コリン欠乏食給餌マウスの肝組織から抽出した microRNA を用い、PCR アレイ法による microRNA のプロファイリングを行った。その結果、有意な発現変化を来す microRNA を複数個同定していた。これらの microRNA のうち、発現亢進が最も顕著であった miR-200b に注目して以後の検討を行った。

(1) メチオニン・コリン欠乏食給餌マウスの肝組織から抽出した microRNA を用い、miR-200b を含む miR-200 family (miR-200a、miR-b、miR-200c、miR-141) の発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。

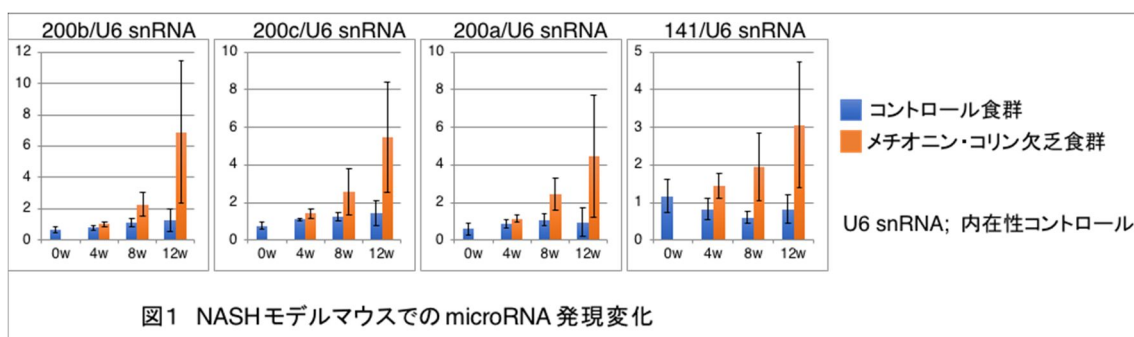
(2) NASH 患者の肝生検標本から microRNA を抽出し、miR-200 family の発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。各 microRNA 発現量と肝生検標本の病理所見との関連を検討した。

(3) メチオニン・コリン欠乏食給餌マウスに miR-200b 配列特異的阻害剤を 4 週間尾静脈投与し、肝炎症および肝線維化に対する影響を検討した。血液を回収し、血清中の肝逸脱酵素値 (AST、ALT) を測定した。また、肝組織より RNA を回収し、炎症関連遺伝子および線維化関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。また、肝組織中の脂質の定量を行い、加えて、病理標本を作成し、脂肪沈着、炎症細胞数および線維化面積について検討した。

(4) ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に miR-200b を過剰発現させ、パルミチン酸刺激による炎症性サイトカイン遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法で定量した。

## 4. 研究成果

(1) メチオニン・コリン欠乏食給餌マウスの肝組織では、コントロール食給餌マウスと比較して、miR-200 family の発現が優位に亢進していた。また、miR-200 family の発現量は飼養週数を経る程に増加していた (図 1)。本検討により、モデルマウスにおいて、NASH の病態と miR-200 family との関連が示唆された。



(2) 非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) 患者 5 例、NASH 患者 27 例 (肝硬変例 11 例) の肝生検標本と用いた検討では、NAFL 患者と比較して、NASH 患者、特に肝硬変を伴う NASH (NASH-LC) 患者で、miR-200 family の発現が優位に亢進していることが明らかとなった (図 2)。本検討により、ヒトにおいてもマウスと同様に、NASH の病態に miR-200 family の発現変化が関連していることが示唆された。

(3) miR-200 family 発現亢進の NASH 病態への関与、miR-200 family 制御の NASH 新規治療法としての可能性を検討するために、in vivo で microRNA 阻害実験を行った。miR-200b 阻害剤投与マウスではコントロール投与マウスと比較して、肝逸脱酵素の低下、炎症関連遺伝子発現 (CCL2、TNF) の低下、線維化関連遺伝子 (TGF- $\beta$ 、ACTA2、COL1A1) 発現の低下を認めた。また、病理組織学的検討でも、活性化マクロファージ数の減少、線維化面積の減少を認めた (図 3)。一方で、肝組織中の中性脂肪量および総コレステロール量に差は認められなかった。これにより、miR-200b 発現亢進が肝脂肪沈着には関与せずに、肝障害、肝炎症および肝線維化の進行に影響していることが明らかとなった。また、miR-200b 阻害が NASH 病態改善に有用であることが in vivo で示された。

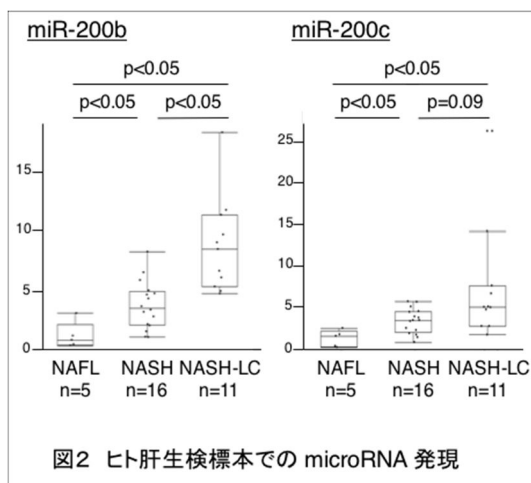


図2 ヒト肝生検標本での microRNA 発現

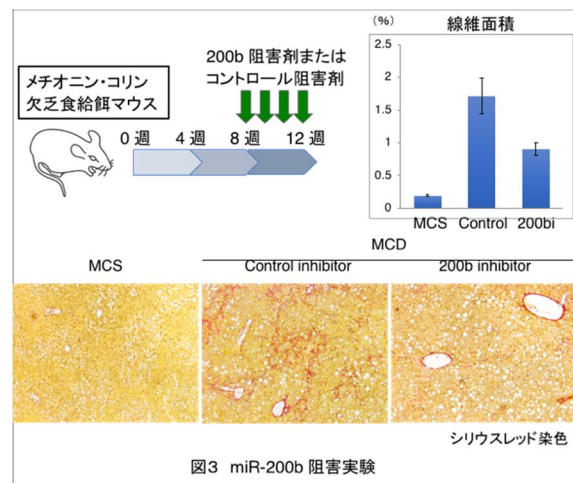


図3 miR-200b 阻害実験

(4) ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に miR-200b を過剰発現させた結果、パルミチン酸刺激による炎症性サイトカイン (TNF、IL-6) の産生亢進を認めた。肝細胞での炎症性サイトカイン産生制御が miR-200b の作用機序の一つである可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

中村昌人, 千葉哲博, 加藤直也. 非アルコール性脂肪肝疾患における肝炎症及び肝線維化に対する microRNA-200b の重要性, 第 104 回日本消化器病学会総会, 2018 年

中村昌人, 丸山紀史, 加藤直也. 血中 microRNA-200b の非アルコール性脂肪肝疾患における肝線維化指標としての有用性に関する検討, 第 54 回日本肝臓学会総会, 2018 年

Masato Nakamura, Tatsuo Kanda, Tomoko Saito, Sadahisa Ogasawara, Yoshihiko Ooka, Eiichiro Suzuki, Shingo Nakamoto, Shin Yasui, Akinobu Tawada, Tetsuhiro Chiba, Makoto Arai, Hitoshi Maruyama, Naoya Kato. Higher serum microRNA-200b levels indicate advanced hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease, APASL single topic conference, 2018.

Masato Nakamura, Tatsuo Kanda, Koji Takahashi, Shingo Nakamoto, Shuang Wu, Shin Yasui, Hitoshi Maruyama, Naoya Kato. The inhibition of microRNA-200b improved liver inflammation and liver fibrosis in NAFLD model mice. AASLD The Liver Meeting. 2017.

中村昌人, 神田達郎, 横須賀収. MicroRNA-200b を介した肝炎症および肝線維化進展機序に関する検討, 第 25 回日本消化器関連学会週間, 2017 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

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。