

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15786

研究課題名(和文)血清マイクロRNAを用いた慢性C型肝炎SVR症例の予後予測法開発

研究課題名(英文) Identification of microRNA associated with the elimination of hepatitis C virus by direct-acting antiviral therapies

研究代表者

田所 智子 (Tadokoro, Tomoko)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50813177

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)：C型肝炎ウイルス(HCV)に対する直接作用型抗ウイルス(DAA)療法において治療に抵抗する宿主因子の同定のため、DAA療法を受けた患者血清中マイクロRNA(miRNA)の変化を解析した。HCVの消失に伴い、どちらの群においてもmiRNAの発現が変化し、特に両群において、miR-762が有意に変化した。miR-762は治療有効群において、HCV排除後に増加し、逆に治療抵抗例では、miR-762は減少した。HCVに感染した培養肝細胞にmiR-762を導入すると、HCV-RNAの複製が有意に減少しmiR-762がDAA療法によるHCV排除に関与する宿主因子の一つであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型肝炎ウイルスは未だに肝硬変・肝細胞癌の主な原因である。

直接作用型抗ウイルス療法によるC型肝炎治療は非常に有効であるが、直接作用型抗ウイルス剤の治療効果は100%ではなく、更に直接作用型抗ウイルス剤自体非常に高額な薬剤である。治療が不成功に終わる宿主要因を特定することにより、より治療成功率が上昇し、肝硬変や肝細胞癌を抑制するだけでなく医療経済面においても有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify host factors that resist treatment with direct-acting antiviral (DAA) therapy for hepatitis C virus (HCV), we analyzed changes in microRNAs (miRNAs) in the serum of patients treated with DAA. The expression of miRNAs changed with the disappearance of HCV in both groups, especially miR-762 was significantly changed in both groups. miR-762 increased after HCV elimination in the treatment-responsive group, while miR-762 decreased in the treatment-resistant cases. miR-762 transfection into HCV-infected cultured hepatocytes significantly reduced HCV-RNA replication, suggesting that miR-762 is one of the host factors involved in HCV elimination by DAA therapy.

研究分野：消化器内科

キーワード：C型肝炎 直接作用型抗ウイルス療法 マイクロRNA 肝硬変 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インターフェロンフリー直接作用型抗ウイルス薬 (Direct Acting Antivirals) DAA 治療による C 型肝炎 (HCV) 抗ウイルス治療により、過去には治療抵抗性とされていた症例を含めて高率にウイルス排除が期待出来るようになった。アスナプレビル/ダクラタスビル (ASV/DCV) 療法は NS3/4A プロテアーゼ阻害剤である ASV と NS5A 阻害剤である DCV を併用する日本で初めて導入された DAA 治療である。2016 年に承認・薬価収載されたグラゾプレビル/エルバスビル (GZV/EBV) 療法は、NS3/4A プロテアーゼ阻害薬である GZV と NS5A 阻害薬である EBV の併用療法であり、腎障害患者にも比較的 safely に使用でき、薬剤耐性ウイルスへの使用も可能であるためジェノタイプ 1 型の慢性 C 型肝炎の治療の中心的薬剤となっているが、治療の成功率は 100% ではなく、このことは強力な DAA を用いても、最終的にウイルスを排除するためには、宿主に関連する特定の要因が必要であることを示唆している。また DAA は高額な薬剤であり、医療経済的にも治療前に治療抵抗群を同定することは有意義である。このような背景のもと研究を開始した。

2. 研究の目的

HCV 患者に潜む治療抵抗因子を検出できる簡便で効率的なバイオマーカーは存在しない。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 で血液中にも存在しており、癌を含む多種疾患の新規診断マーカーとしても期待されている。血清 miRNA には複数の存在形式があり、病態と密接に関連するのはエクソソーム (細胞外分泌小胞) 内 miRNA とされているが、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。DAA 治療前後の C 型慢性肝炎・肝硬変患者血清から抽出したエクソソーム miRNA を解析し病態、臨床経過との関連性を検証することで、治療の予後予測のための非常に優れたバイオマーカー確立を目的とした。

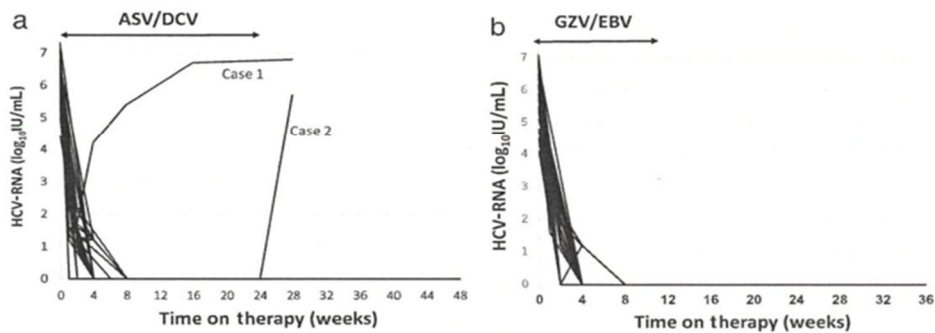
3. 研究の方法

本研究は、ヘルシンキ宣言の倫理原則に従って実施され、香川大学医学部倫理委員会の承認を得た。対象は HCV ジェノタイプ 1b 感染による慢性肝炎 (CH) および代償性肝硬変 (LC) の成人患者。全ての患者は、研究に参加する前に、書面によるインフォームド・コンセントを得た。HCV 薬剤耐性変異を PCR-invader assay により評価した。治療終了後 24 週目にウイルス陰性化 (SVR24) を達成した症例について miRNA のアレイ解析を行った。治療開始の 0~6 週間前と 4~8 週間後に採取した患者血清から miRNeasy Mini Kit を用いて totalRNA を抽出した。RNA 6000 Nano kit で RNA を測定後にサンプルを mercury Hy3 Power Labeling kit で標識し 2565 分子を搭載したヒト miRNA オリゴチップにハイブリダイズさせ網羅的に解析した。HCV 排除前と排除後で発現量の異なる miRNA を、Mann-Whitney U-test を用いて決定し、クラスター解析を行い、各 miRNA の相対的な発現強度を示すヒートマップを作成した。そこで統計学的に有意差を認められた miRNA についてリアルタイム PCR をを行い、発現量を測定した。HCV の複製に対する特定の miRNA の効果を確認するため、Huh-7 肝細胞を用いた HCV ゲノムレプリコンに miRNA のミミックおよびコントロールを導入し、48 時間後の細胞溶解液中 HCV RNA を定量した。

4. 研究成果

ASV/DCV 療法 24 週を行った群 25 名と GZV/EBV 療法 12 週を行った群 32 名について解析した。年齢の中央値は、ASV/DCV 群が 69.5 歳、GZV/EBV 群が 71.5 歳で、両群とも性差はなかった。ASV/DCV 群の 36%、GZV/EBV 群 9% が代償性肝硬変の状態であった。HCV 薬剤耐性変異解析では薬剤耐性変異 (L31M/V、Y93H、D168E) はいずれの患者でも確認されなかった。ASV/DCV 療法を受けた 25 例中 23 例では、治療開始後 12 週間以内に HCV 陰性化が認められ、その後 SVR24 が達成された。しかし、2 人の患者ではウイルス陰性化が得られず、治療期間中にウイルスのブレイクスルーが見られたもの (case1) と治療終了後に再発したもの (case2) があつた (図 1)。GZV/EBV 療法を受けた全ての患者において開始後 6 週間以内に HCV RNA の陰性化が認められ SVR24 を達成した。

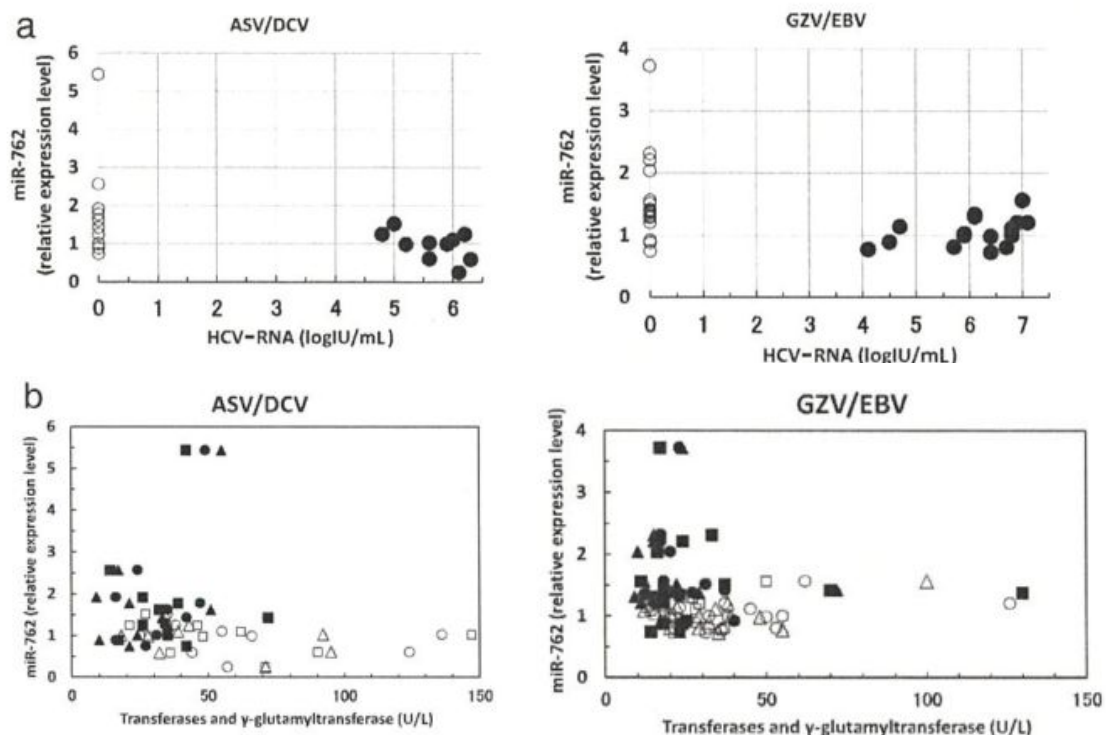
図 1



両群において SVR24 を達成した患者血清を用いて治療前後での miRNA の発現についてアレイチップを用いて網羅的に解析したところ、両群ともに統計的に優位な変化を認めたのは hsa-miR-762 のみであり、HCV 陰性化に伴って発現が増加していた。また GZV/EBV グループの患者の血清から抽出したエクソソームの miRNA を網羅的に解析したところ、ほとんど全ての症例で HCV RNA の消失とともにエクソソーム中の miR-762 が増加していた。このため hsa-miR-762 が HCV 陰性化に関わる因子の可能性があると考え、リアルタイム PCR を用いて発現量を検証した。

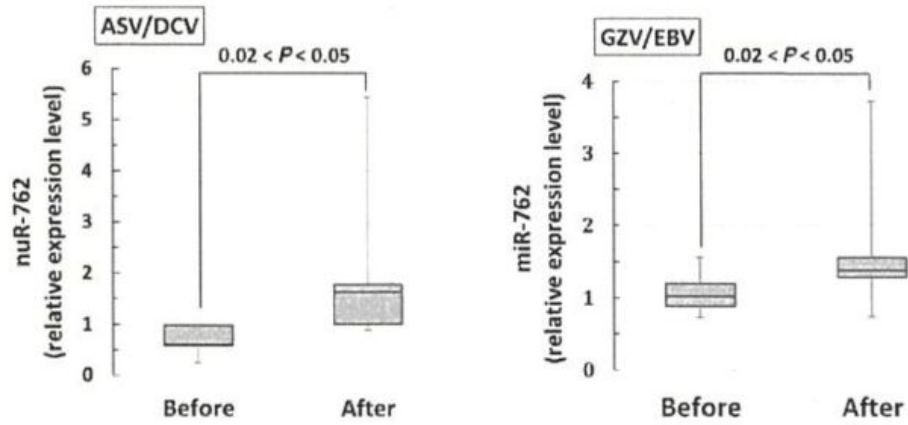
治療前の miR-762 の発現量と血清 HCV RNA および血清肝胆道系酵素には関連は認められなかった (図 2a、2b)。

図 2



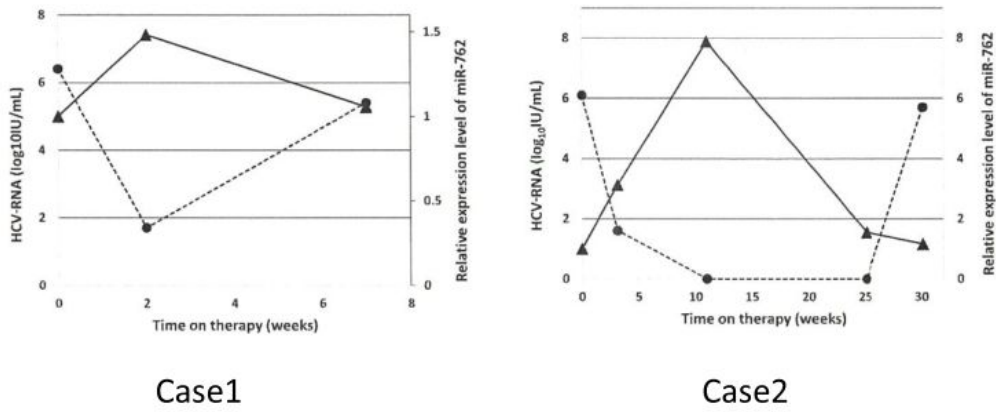
治療前と HCV RNA 消失後を比較すると、リアルタイム PCR で定量した血清中の miR-762 レベルは、消失後に有意に上昇していた(図 3)。

図 3



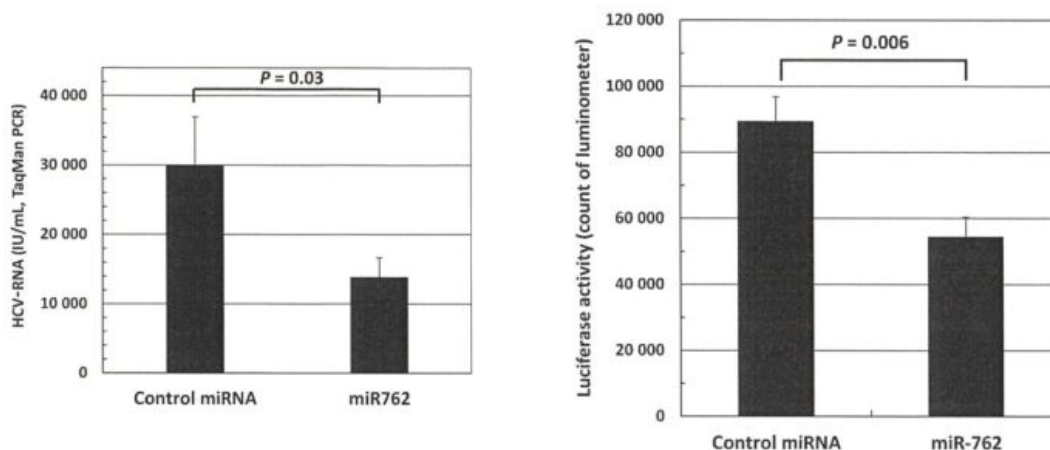
次に、ASV/DCV が奏功しなかった症例について治療期間中の miR-762 の発現量を定量したところ、HCV RNA との間に逆相関の関係を認めた(図 4)。

図 4



肝細胞における miR-762 の HCV 複製への影響を調べるため、ジェノタイプ 1 の HCV レプリコンシステムを用いて細胞内導入実験を行った。合成した miR-762 をレプリコン細胞に導入したところ、HCV の RNA 複製がコントロールと比較して有意に抑制された(図 5)。同様にジェノタイプ 2 の HCV レプリコンシステムでも、ジェノタイプ 1 の場合と同様に HCV の RNA 複製が有意に抑制された。

図 5



これらの結果から、miR-762 は、DAA 療法による HCV 排除に関係する宿主因子である可能性が示された。

miR-762 の標的遺伝子を検索した結果では、HCV RNA 遺伝子上に標的となりうる塩基配列は存在しなかった。したがって、miR-762 は、肝細胞の遺伝子を標的にして、最終的に HCV の複製を負に制御している可能性がある。miR-762 をターゲットとした治療法が開発されれば、DAA 不応例の治療に応用できる可能性があると考えられ今後の検討課題とされる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoneyama Hirohito, Tadokoro Tomoko, Masaki Tsutomu et al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of microRNA associated with the elimination of hepatitis C virus genotype 1b by direct acting antiviral therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山弘人、田所智子 他
2. 発表標題 miR-762はDAA治療経過中のゲノタイプ1型HCV排除に際して血清中に増加する
3. 学会等名 第22回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------