

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K15792
研究課題名(和文) B型肝炎での血清エクソソーム中マイクロRNAを用いた新規肝発癌予測マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel predictive markers for HCC development using exosomal miRNA information in patients with chronic hepatitis B virus infection

研究代表者
小塚 立蔵 (Kozuka, Ritsuzo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10726657
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)：B型慢性肝疾患で、肝線維化進展に伴って変化する血清エクソソーム中のmiRNAを解析し、miR-3648、miR-3665、miR-122-5p、miR-3960、miR-4739の5つのmiRNAが同定された。さらに、核酸アナログ(NA)投与例とNA非投与例で肝発癌と相関するmiRNAを解析した。NA非投与例では、22種類のmiRNA発現パターンを組み合わせることで肝発癌予測は可能であったが、NA投与例では、この組み合わせで予測できなかった。B型慢性肝疾患の肝発癌を予測するmiRNA発現パターンはNA投与例とNA非投与例では異なり、NA治療介入が肝発癌メカニズムを変化させる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスを完全に排除する治療法はなく、多くのB型慢性肝疾患患者に核酸アナログ(NA)治療が行われ、肝発癌をいかに抑制するかが最大の治療目標となっている。一方、肝線維化進展や肝発癌を予測できるバイオマーカーの開発が望まれるが、血清エクソソーム中のmiRNAは安定性が高く、新たなバイオマーカーとして期待される。本研究では、肝線維化進展や肝発癌と相関する血清エクソソーム中のmiRNAを同定した。また、肝発癌予測に関するmiRNA発現パターンがNA治療の有無により異なり、肝発癌メカニズムがNAで変化することが示され、NAによる肝発癌抑制の機序を明らかにしたことは学術的に意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed exosomal miRNA associated with progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection, and identified five miRNAs, i.e., miR-3648, miR-3665, miR-122-5p, miR-3960, and miR-4739. In addition, we analyzed miRNAs that correlate with development of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients treated and untreated with nucleos(t)ide analogue (NA), and identified that predictive accuracy of HCC development is increased by using a combination of 22 miRNA expression patterns in patients untreated with NA. However, it was impossible to predict by using this combination in patients treated with NA. The miRNA expression pattern that predicts HCC development in patients with chronic hepatitis B virus infection differs between patients treated and untreated with NA, suggesting that NA treatment may change the mechanism of HCC development.

研究分野：消化器分野

キーワード：B型肝炎 肝発癌 エクソソーム マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の肝臓による死亡者数は、約 25,000 人と悪性新生物の中では第 5 位を占めているが、その原因として B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) は、C 型肝炎ウイルスと並んで重要である。HBV は、肝細胞に一旦感染すると、covalently closed circular DNA として核内に存在し続け、現行の治療法では完全排除することはできない。一方、実臨床の現場では、多くの B 型慢性肝疾患患者に対して核酸アナログ (nucleos(t)ide analogue; NA) による治療が行われているが、根治することは困難である。このため、NA で血中 HBV-DNA 量を低下させ、肝発癌をいかに抑制するかが最大の治療目標となっている。

(1) B 型肝炎での NA 投与例における肝発癌危険因子の検討

NA は HBV に対して強い複製抑制効果を有し、血中の HBV-DNA 量を低下させるだけでなく、肝発癌抑制効果も報告されている (Liaw YF, *et al. N Eng J Med.* 2004)。一方、NA は多数の B 型慢性肝疾患患者で投与されているが、肝炎は沈静化されるにも関わらず、肝臓の発生が依然として認められるため、肝発癌危険因子の網羅的な検討が現在まで行われてきた。

我々は、すでに関連する研究から NA 開始後の肝発癌の特徴を、ウイルス・宿主・環境因子の観点から検討し、肝硬変や宿主遺伝子多型である HLA-DQA1/DRB1-SNP (rs9272105) の AA genotype 例で、発癌率が有意に高いことを新たに明らかにした (Kozuka R, *et al. J Gastroenterol Hepatol.* 2019)。

(2) 肝発癌予測バイオマーカーとしての miRNA の可能性

NA 開始後の肝発癌の検討は、臨床情報からの解析に限られており、発癌予測マーカー開発までの踏み込んだ研究はほとんどない。このため、NA 開始中の肝発癌を正確に予測できるマーカーを見出すことは喫緊の課題である。最近、特定の遺伝子の発現を調節する因子として miRNA が注目されている。miRNA は 20~25 塩基ほどの 1 本鎖の non-coding RNA であり、発生、細胞の分化誘導、発癌、疾患の起因や進行に関わっている。また、miRNA は、臓器や細胞ごとに発現プロファイルが異なり、その発現に個人差が少ない。循環血中の miRNA のうち、血中のエクソソームと呼ばれる脂質膜を持った 100 nm の小胞体内に存在する miRNA は、安定した状態で存在するため、種々の病態を診断するバイオマーカーとして利用できる。

(3) 肝線維化または肝発癌と miRNA の関係性

肝炎ウイルスの持続感染は肝細胞の慢性的な壊死を惹起し、それに対する非実質細胞 (肝星細胞、筋線維芽細胞) による炎症修復と肝細胞の再生の反復が、肝線維化と発癌に繋がる。また、肝線維化進展は発癌の前段階であり、肝線維化進行度を把握することは、発癌を予測する上で重要である。これまで肝線維化の評価は肝生検での病理診断で行われてきたが、侵襲的であり反復検査は不可能である。そこで、血清バイオマーカーなど非侵襲的な方法で肝線維化を診断することは臨床的に重要な課題である。一方、血清エクソソーム中の miRNA は、C 型肝炎では、種々の miRNA の発現パターンを組み合わせることで、肝臓の炎症と線維化の診断が可能と報告された (Murakami Y, *et al. PLoS One.* 2012)。B 型肝炎でも、肝線維化を診断する上で利用できる可能性が高い。さらに、発癌の前段階である肝線維化進展と相関する miRNA は、肝線維化の診断にとどまらず、肝発癌を予測するバイオマーカーとしても期待される。

2. 研究の目的

B 型慢性肝疾患において、新規肝発癌予測マーカーとなりうる血清エクソソーム中の miRNA を同定することを目的とする。特に、肝線維化進展および HLA-DQA1/DRB1-SNP との関係性から感度・特異度の高い miRNA を見出し、臨床応用可能なバイオマーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

B 型慢性肝疾患例で、肝線維化進展かつ肝発癌と相関する血清エクソソーム中の miRNA を、miRNA マイクロアレイを用いて同定する。さらに、HLA-DQA1/DRB1-SNP との関係性から感度・特異度の高い miRNA マイクロアレイを明らかにする。

対象は、大阪市立大学医学部附属病院に受診した B 型慢性肝疾患患者のうち、血清を採取できた 193 例。NA 投与例は 103 例、NA 非投与例は 90 例であった。NA 投与例のうち、発癌例は 13 例、非発癌例は 90 例であった。NA 非投与例のうち、発癌例は 49 例、非発癌例は 41 例であった。B 型慢性肝疾患 193 例の血清から、Exoquick を用いて、エクソソーム画分を回収し、miRNeasy mini kit で miRNA を抽出した。抽出した miRNA を用いて、miRNA マイクロアレイ (Agilent human miRNA microarray Rel 14.0) で発現プロファイルを解析した。

(1) 肝線維化進展と相関する miRNA の検討

B 型慢性肝疾患 193 例のうち、病理組織検査で肝線維化進展度を診断できた 169 例 (88%) であった。肝線維化進展度は、F0/1/2/3/4 : 8/80/41/24/16 例であった。169 例のうち、miRNA マイクロアレイ解析が可能であった 167 例を対象とし、肝線維化進展に伴って変化する miRNA を同定した。

(2) 肝発癌と相関する miRNA の検討

B 型慢性肝疾患 193 例のうち、NA 投与例 103 例での発癌例 13 例と非発癌例 90 例、NA 非投与例 90 例での発癌例 49 例と非発癌例 41 例の 4 群に分けた。NA 投与例および NA 非投与例で、年齢をマッチさせた症例をピックアップし、NA 投与例では、発癌例 13 例と非発癌例 58 例、NA 非投与例では、発癌例 40 例と非発癌例 26 例における miRNA 発現パターンを比較し、NA 投与例および NA 非投与例における肝発癌と相関する miRNA を同定した。

(3) 肝線維化進展かつ肝発癌と相関する miRNA と HLA-DQA1/DRB1-SNP(rs9272105) との関係性の検討

B 型慢性肝疾患 193 例のうち、DNA を採取できた 150 例(78%)を対象とした。その内訳は、NA 投与 103 例のうち 86 例(発癌群 11 例、非発癌群 75 例)、NA 非投与 90 例のうち 64 例(発癌群 33 例、非発癌群 31 例)であった。HLA-DQA1/DRB1-SNP の genotype はリアルタイム PCR 法で決定した。肝線維化進展かつ肝発癌と相関する miRNA を、HLA-DQA1/DRB1-SNP genotype 別に比較した。

(4) miRNA マイクロアレイ発現解析の validation

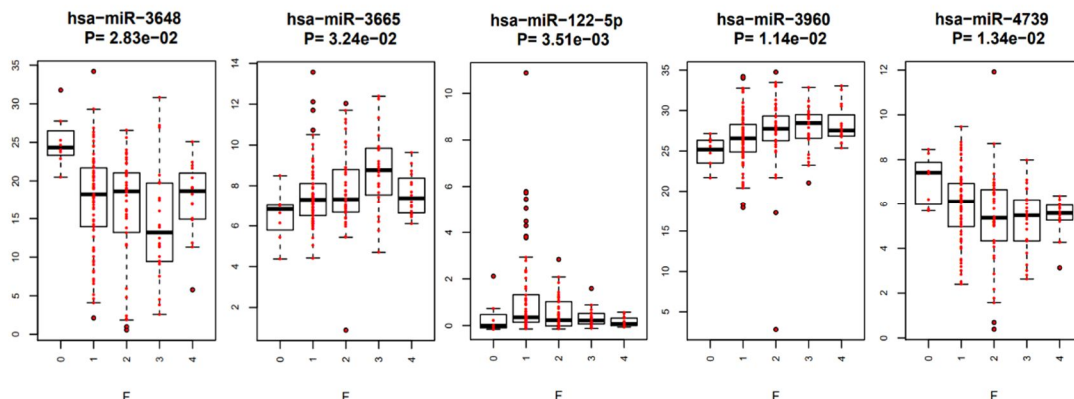
肝線維化進展や肝発癌と相関する miRNA について、miRNA マイクロアレイの発現量とリアルタイム PCR の発現量との相関性について検討した。

4. 研究成果

(1) 肝線維化進展と相関する miRNA の検討

病理組織検査で肝線維化進展度を診断できた 169 例(88%)のうち、miRNA マイクロアレイ解析が可能であった 167 例を対象とし、肝線維化進展に伴って変化する miRNA を多変量解析で検討したところ、miR-3648(p=0.028)、miR-3665(p=0.032)、miR-122-5p(p=0.0035)、miR-3960(p=0.011)、miR-4739(p=0.013)の 5 つの miRNA が同定された(図 1)。

(図 1)



(2) 肝発癌と相関する miRNA の検討

NA 非投与例での miRNA を用いた肝発癌予測

NA 非投与例では、個々の miRNA 発現パターンは発癌例、非発癌例で有意差を認めなかったが、22 種類の miRNA(miR-451a、miR-8072、miR-4745-5p、miR-4516、miR-5100、miR-3648、miR-7975、miR-6131、miR-3665、miR-1260b、miR-4787-5p、miR-6090、miR-122-5p、miR-4286、miR-4488、miR-7977、miR-3960、miR-4739、miR-4454、miR-6869-5p、miR-4497、miR-1260a)の発現パターンを組み合わせると肝発癌を予測することが可能であった(p=1.12e-07、オッズ比:22.15、AUC:0.89)(表 1)。

表 1	発癌の有無		
	発癌なし	発癌あり	
22 種類の miRNA を用いた発癌予測	発癌しないと予測	21	6
	発癌すると予測	5	34

(説明) 発癌しないと予測して実際に発癌しなかったのは 21 例、発癌したのは 6 例であった。一方、発癌すると予測して実際に発癌しなかったのは 5 例、発癌したのは 34 例であった。

NA 投与例での miRNA を用いた肝発癌予測

NA 投与例では、個々の miRNA 発現パターンは発癌例、非発癌例で有意差を認めなかった。また、NA 非投与例で用いた 22 種類の miRNA 発現パターンを組み合わせ、NA 投与例における肝発癌予測を行ったが予測することはできなかった(表 2)。

表 2	発癌の有無		
		発癌なし	発癌あり
22 種類の miRNA を 用いた発癌予測	発癌しないと予測	19	2
	発癌すると予測	39	11

(説明) 発癌すると予測して実際に発癌したのは 11 例、発癌しなかったのは 39 例であった。一方、発癌しないと予測して実際に発癌しなかったのは 19 例、発癌したのは 2 例あった。

以上から、22 種類の miRNA 発現パターンを組み合わせると NA 非投与例での肝発癌予測は可能であった。しかし、NA 投与例でこの 22 種類の miRNA 発現パターンを用いて、肝発癌との関連性を解析したが、肝発癌予測はできなかった。よって、B 型慢性肝疾患における肝発癌を予測する miRNA 発現パターンは、NA 投与例と NA 非投与例では異なっており、NA 投与による治療介入が肝発癌メカニズムを変化させる可能性が考えられた(治療介入による肝発癌抑制効果)。

(3) 肝線維化進展かつ肝発癌と相関する miRNA と HLA-DQA1/DRB1-SNP(rs9272105) との関係性の検討

NA 投与例において、発癌例と非発癌例における HLA-DQA1/DRB1-SNP の AA genotype の割合を検討したところ、発癌例では AA genotype の割合は 46%であり、非発癌例の 20%と比べて高い傾向を示した($p=0.074$)。一方、NA 非投与例において、発癌例と非発癌例における HLA-DQA1/DRB1-SNP の AA genotype の割合を検討したところ、発癌例では AA genotype の割合は 42%であり、非発癌群例 13%と比べて有意に高かった($p=0.0086$)。

NA 非投与例において 22 種類の miRNA 発現パターンを組み合わせると肝発癌予測が可能であった。また、この 22 種類の miRNA のうち、肝線維化進展に伴って変化する miRNA と共通するものは、miR-3648、miR-3665、miR-122-5p、miR-3960、miR-4739 であった。この 5 つの miRNA は肝線維化進展および肝発癌と共通する miRNA であるため、miRNA 発現量と HLA-DQA1/DRB1-SNP との関係性を検討するため、AA genotype 例と non-AA genotype 例で比較したが、miR-3648($p=0.72$)、miR-3665($p=0.17$)、miR-122-5p($p=0.32$)、miR-3960($p=0.22$)、miR-4739($p=0.62$)のいずれの miRNA においても両群で有意差は認めなかった。

(4) miRNA マイクロアレイ発現解析の validation

NA 非投与例で肝発癌予測に用いた miRNA に関して、miRNA マイクロアレイの発現量とリアルタイム PCR の発現量との相関性について検討した。相関性をみるため、肝発癌予測に用いた 22 種類の miRNA のうち、肝線維化進展に伴って変化する miRNA と共通した miR-3648、miR-3665、miR-122-5p、miR-3960、miR-4739 で検討することとした。miR-3648($r=0.24$, $p=0.058$)では弱い相関を認めたが、miR-122-5p($r=0.20$, $p=0.16$)、miR-3665($r=0.12$, $p=0.41$)、miR-4739($r=0.067$, $p=0.73$)のいずれも、miRNA マイクロアレイの発現量とリアルタイム PCR の発現量において有意な相関は認めなかった。

結論としては、肝線維化進展に伴って変化する miRNA を解析し、miR-3648、miR-3665、miR-122-5p、miR-3960、miR-4739 の 5 つの miRNA が同定された。NA 投与例と NA 非投与例で肝発癌と相関する miRNA を解析し、NA 非投与例では、22 種類の miRNA 発現パターンを組み合わせると肝発癌予測が可能であったが、NA 投与例では同様の組み合わせで肝発癌を予測することはできなかった。B 型慢性肝疾患において肝発癌を予測する miRNA 発現パターンは、NA 投与例と NA 非投与例では異なっており、NA 投与による治療介入が肝発癌メカニズムを変化させる可能性が考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ritsuzo Kozuka, Masaru Enomoto, Minh Phuong Dong, Hoang Hai, Le Thi Thanh Thuy, Naoshi Odagiri, Kanako Yoshida, Kohei Kotani, Hiroyuki Motoyama, Etsushi Kawamura, Atsushi Hagihara, Hideki Fujii, Sawako Uchida-Kobayashi, Akihiro Tamori, Norifumi Kawada	4. 巻 12
2. 論文標題 Soluble programmed cell death-1 predicts hepatocellular carcinoma development during nucleoside analogue treatment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03706-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小塚立蔵
2. 発表標題 可溶性免疫チェックポイント分子から見た核酸アナログによるHBV制御後の肝発癌危険因子の検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小塚立蔵
2. 発表標題 核酸アナログによるHBV制御後のHLA-SNPを用いた肝癌サーベイランスについて
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020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
---------	---------