

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08447

研究課題名(和文)自己免疫性肝炎におけるエクソソームの網羅的解析と病態への関与

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of exosomes in autoimmune hepatitis and involvement in pathology

研究代表者

大平 弘正(Ohira, Hiromasa)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90274951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自己免疫性肝炎(AIH)の血清エクソソームのmiRNAを網羅的に検討し、miR-557の発現レベルが、原発性胆汁性胆管炎などの対照疾患に比し有意に高いことを明らかにした。また、miR-557高値は、AIH患者の再発リスクと関連していた。miR-557mimicによる末梢血単核細胞のmiR-557発現の増加により、TNF、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカイン発現が増強されることが明らかとなった。以上の成績から、miR-557はAIHの診断バイオマーカーとして重要な役割を果たす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性疾患である自己免疫性肝炎(AIH)は原因が不明であり、疾患特異的マーカーの同定や病態解明ならびに治療抵抗例に対する治療法開発が急務となっている。本研究の成果により新たな診断バイオマーカーとして、miR-557が候補の一つとなり、疾患の再燃予測にも有用性が期待される。さらに、miR-557を治療標的とする新たな治療薬開発にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study investigated serum microRNAs (miRNAs) in autoimmune hepatitis (AIH) and the relationship of these molecules with diagnostic and relapse markers. The microarray results revealed that EV miR-557 expression levels were higher in serum samples from patients with AIH than in those from patients with primary biliary cholangitis. In addition, serum EV-miR-557 levels >7.69 copies/ μ L were associated with a significantly higher risk of relapse in patients with AIH. Gene expression analysis revealed that increased miR-557 expression following transient transfection of peripheral blood mononuclear cells with a miR-557 mimic resulted in enhanced expression of proinflammatory cytokine-related genes such as TNF, IL-6 and IFN- γ . In conclusion, EV-miR-557 may play an important role as a potential biomarker of AIH and may be a promising therapeutic target for AIH.

研究分野：肝臓病学

キーワード：自己免疫性肝炎 エクソソーム microRNA

1. 研究開始当初の背景

細胞から体液中に分泌される脂質二重膜小胞「エクソソーム」はタンパク質や核酸を内包し、癌転移や免疫応答など種々の生体内イベントに関与している。また、エクソソームを標的・活用した治療法の開発も検討されている^{1,2)}。自己免疫性疾患である自己免疫性肝炎(AIH)は原因が不明であり、疾患特異的マーカーの同定や病態解明ならびに治療抵抗例に対する治療法開発が急務となっている³⁾。肝疾患においても、エクソソーム中 miRNA を利用して C 型、B 型慢性肝炎および非アルコール性脂肪性肝炎の鑑別や肝臓の炎症や線維化の進行度を評価する報告もなされている。しかし、AIH においては、エクソソームが診断特異的なマーカーとなり得るか否か、また、本症の自然免疫応答や免疫担当細胞の活性化、肝実質細胞・肝類洞内皮細胞と免疫担当細胞との細胞連関にエクソソームが如何に関与しているかについては明らかとなっていない^{4,5)}。しかし、AIH においてもエクソソームによる免疫応答が病態進展に関与していることが推察され、その解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では AIH 患者血液中のエクソソームの網羅的 miRNA 解析を行い、疾患特異的な miRNA の同定と miRNA・エクソソームと免疫担当細胞との関連について、各種サイトカイン産生から検討し、AIH の病態形成への役割を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの網羅的 miRNA 解析

同意の得られた AIH 4 例、正常ボランティア 4 例の血清から exoRNeasy Serum Plasma Kits (QIAGEN) を用いてエクソソーム由来の miRNA を抽出し、濃度測定の後、miRNA 解析を行った。

(2) miRNA アレイ解析の検証

miRNA アレイ解析結果から正常者と有意差のある miRNA を選択し、これら miRNA の標的遺伝子候補を検索し生理活性を調べた。また、細胞内伝達系シグナルについては Dina-miRpath ver3 を用いてパスウェイ解析を行った。

(3) デジタル PCR の解析

候補 miRNA の発現量をデジタル PCR にて、AIH 患者 26 例、正常者 12 例、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) 12 例、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 12 例の血清を用いて診断マーカーとなり得るかを検討した。さらに肝線維化との関連も検討した。AIH においては、さらに発症型、臨床検査値との関連、再発率について検討した。

(4) 末梢血単核球と候補 miRNA との関連解析

健康者末梢血単核球 (PBMC) を分離し、miR-557 mimic をトランスフェクションし、24 時間培養後、リアルタイム PCR 法にてサイトカイン mRNA の発現を測定した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの網羅的 miRNA 解析

網羅的 miRNA 解析により、階層的クラスタリング (図 1a) 主成分解析 (図 1b) の結果、大きく 2 つの群に分かれることが示された。AIH 群で発現上昇した miR28 種、発現低下した miR13 種が同定された。既報の miR との重複は認めなかった。AIH で発現上昇した miR のうち上位 3 つのうち miR-557 が抽出された。

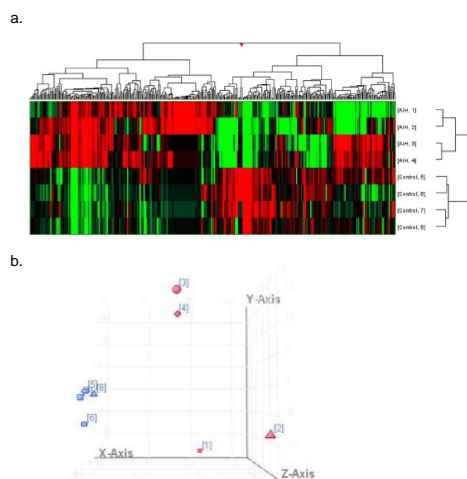
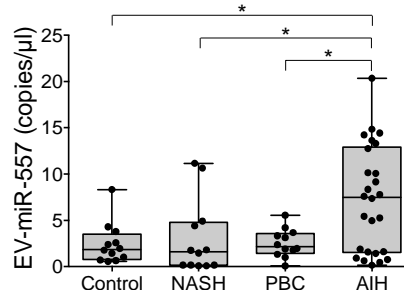


図 1

(3) デジタル PCR の解析

候補 miR の発現量を検証するために、別の AIH 患者 26 例を対象に血清を用いてデジタル PCR を行なった。AIH 患者 26 例の背景は、年齢中央値 61 歳、男女比 2:24、発症型 急性 15 例 (58%)、慢性 11 例 (42%)、再燃 6 例 (23%)、観察期間中央値 79 ヶ月。AIH における miR-557 の発現量 (7.47 copies/ μ L) は、健常者 (1.86 copies/ μ L; $P < 0.05$)、PBC (2.16 copies/ μ L; $P < 0.05$)、NASH (1.60 copies/ μ L; $P < 0.05$) と比較して有意に上昇していた (図 2)。AIH において急性発症型と比較して慢性型で高値であり、AST と正の相関を認めた ($r=0.663$, $P < 0.05$)。miR-557 高値群 (7.69 copies/ μ L) は低値群 (7.69 copies/ μ L) と比較して有意に累積再燃率が高値であった (7-year incidence rate 16.7 vs. 54.5 %, log-rank test, $P < 0.05$)。

図 2



(4) 末梢血単核球と候補 miRNA との関連解析

miR-557 mimic をトランスフェクションした健常者 PBMC では、TNF、IL-6、IFN- γ の mRNA 発現が有意に上昇した ($P < 0.05$) (図 3)。

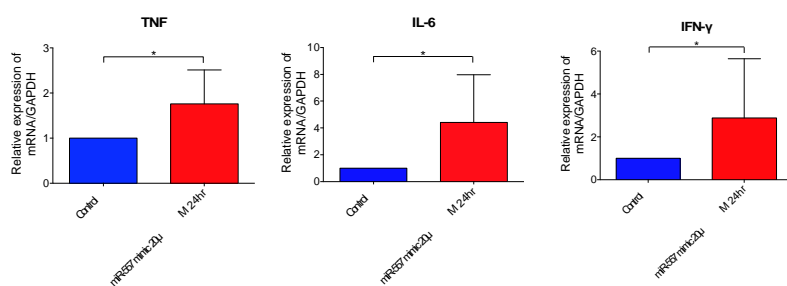


図 3

< 引用文献 >

1. Suzuki R, Asama H, Waragai Y, Takagi T, Hikichi T, Sugimoto M, et al. Fibrosis-related miRNAs as serum biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017; 17: 4451-4460.
2. Sato Y, Suzuki R, Takagi T, Sugimoto M, Ohira H. Circulating extracellular vesicle-encapsulated microRNA as screening biomarkers for intraductal papillary mucinous neoplasm. *Oncol Lett*. 2020. doi: 10.3892/ol.2020.12178.
3. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 1996; 334:897-903.
4. Migita K, Komori A, Kozuru H, Jiuchi Y, Nakamura M, Yasunami M, et al. Circulating microRNA profiles in patients with Type-1 autoimmune hepatitis, *PLoS One* 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136908.
5. Huang C, Xing X, Xiang X, Fan X, Men R, Ye T, et al. MicroRNAs in autoimmune liver diseases: from diagnosis to potential therapeutic targets. *Biomed Pharmacother*. 2020. doi: 10.1016/j.biopha.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 阿部和道, 鈴木 玲, 大平弘正
2. 発表標題 自己免疫性肝炎における血中エクソソームの網羅的miRNA解析の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------