

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：16201  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K11531  
研究課題名(和文) 体組成計測とマイクロRNA測定による非アルコール性脂肪性肝疾患の重症化予測法開発

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

研究代表者  
米山 弘人 (Yoneyama, Hirohito)  
香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：80294750  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の中から肝関連死亡が多い非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の高危険群を選別する簡便な診断法開発を目指し、体組成計測と血清マイクロRNA(miRNA)測定を組み合わせたNASH発症予測法の確立を目指した。  
当施設で病理診断されたNAFLD/NASH患者に生体電気インピーダンス法で体組成計測を行うと同時に患者血清miRNAを網羅的に解析した。体組成は5種類に分類され、各群のNASH-非NASH間で各miRNAの発現強度を比較した所、NASH症例で特異的に発現強度が変化しているmiRNA分子種が複数同定でき、更に特定の体組成型でこの傾向が強い事が示された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHの早期診断・発症予測の研究は全世界で行われ、最新の血清バイオマーカーや画像検査法が数多く提案されているが感度・特異度に問題がある。その最大の原因は本疾患の発症進展に最大の影響を及ぼす患者体組成の観点を欠いている事であると思われる。短時間・簡便に行える体組成計測による栄養学的視点を血清miRNA解析に導入した本研究の成果はNASH診断・予測の研究分野に大きなインパクトをもたらすと考える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a simple diagnostic method to select high-risk groups for nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is associated with a high rate of liver-related deaths, from among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to establish a method for predicting the onset of NASH by combining body composition measurement and serum microRNA (miRNA) measurement.  
We performed body composition measurements using bioelectrical impedance analysis on NAFLD/NASH patients who were pathologically diagnosed at our institution, and simultaneously performed comprehensive analysis of serum miRNAs in the patients. Body composition was classified into five types, and the expression intensity of each miRNA was compared between NASH and non-NASH groups. Several miRNA molecular species were identified whose expression intensity was specifically changed in NASH cases, and it was shown that this tendency was stronger in certain body composition types.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 体組成計測 マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

NAFLD は過栄養と活動量不足から内臓脂肪型肥満・高血糖・高血圧・脂質異常を発現するメタボリックシンドロームの肝臓における表現形であり、脂肪肝(肝細胞内の中性脂肪沈着) + 肝障害で定義される。NAFLD の中でも肝障害が進展し肝硬変や肝細胞癌を高率に発症する NASH は NAFLD と共に近年有病率が急上昇しており、近い将来 NASH がウイルス性肝疾患に代わり致命的慢性肝疾患の第 1 位になると予測されている。血清マーカーや血小板数等から肝発がんのハイリスク群を絞り込み、効率的スクリーニングが可能な B、C 型ウイルス性肝炎に比べ、膨大な数の NAFLD 患者から将来 NASH に移行し肝硬変、肝発がんを発症するハイリスク群を絞り込む事は現在困難である。そのため健康診断や人間ドッグを契機に NAFLD が多数診断されているにも関わらず、その重症型となる NASH 患者が医療機関で適切にフォローされず肝硬変や早期肝癌の発症が見逃され、進行段階で専門医へ紹介される例が後を絶たない。従って膨大な NAFLD の中から将来 NASH へ移行する高危険群を正確に絞り込み、嚴重フォローすべき患者を選別することは肝臓病学および予防健康医学において緊急の課題である。

### 2. 研究の目的

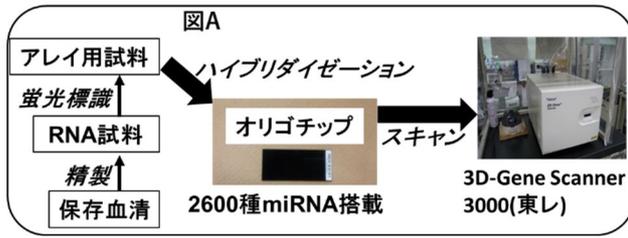
これまでヒアルロン酸、4 型コラーゲン 7 S、Mac-2 結合糖鎖修飾異性体、サイトケラチン 18 断片など多種の血清マーカーを用いた予後予測法が提案されているが未だ正確で効率的な方法は存在しない。従来手法は基礎研究から病態との関連性が指摘された血清バイオマーカーから NASH 発症予測を目指すものであるが、内臓脂肪増加、肝臓や筋肉への異所性脂肪沈着など NASH 発症の背景にある中心病態を表す体組成変化そのものを NASH 発症予測に組み入れた報告はない。多くの医療機関の臨床栄養部門では NASH/NAFLD 患者の栄養指導の際に体組成計測が実施されておりその解析から、体脂肪率と筋肉量は症例間でバラエティに富み、栄養学的に体組成の観点から見ると NASH/NAFLD は均質ではなくヘテロな集団であることが示されている。この様な集団に対し、体組成の影響を強く受ける従来の血清バイオマーカーを適用する事は診断精度を落としてしまうと推測される。以上の観点から体組成に影響されない新規バイオマーカーと体組成計測の組み合わせが正確な NAFLD 重症化予測に有用と考えられる。そこで NASH 発症で最重要の肝内イベントである肝細胞変性と肝線維化の進行を体組成に影響されず血清中にとらえる事ができるバイオマーカーとして本研究者はマイクロ RNA (miRNA) に着目した。miRNA は遺伝子の転写・発現を制御する non-coding small RNA で多くの細胞機能に関わる。ある細胞内イベントを引き起こした特定の miRNA はその一部がエクソソームの形で細胞外へ分泌され血液中に循環するため血清 miRNA は他の生体要因に影響されず特定の病態を高感度で検出し、次世代バイオマーカーとして多疾患への応用が期待されている。当研究者は小規模な予備的研究で NASH/NAFLD 症例を体組成計測により体脂肪率と筋肉量の組み合わせで分類し、夫々の血清 miRNA 発現パターンを NASH-非 NASH 間で比較したところ、NASH 症例で強く発現する miRNA が複数種存在し、その種類は各体組成型により異なっていた。さらに興味深いことに初回診断時は NASH でなかったが数年後の再検時に NASH に進行していた症例の初回診断時の血清に上記特定 miRNA の強発現がすでに認められていた。この結果は体組成計測と血清 miRNA 測定との組み合わせで NASH 発症を正確に予測にできる事を強く示唆する。そこで本研究は統計解析可能なレベルに規模を拡大して当施設で NAFLD、NASH と診断された症例で体組成計測と血清 miRNA の網羅的解析を行い、体組成型別に NASH 特異的に発現する miRNA 分子種を同定し、診断・予測アルゴリズムを構築する。本研究は NASH/NAFLD の中心病態を反映する体組成という栄養科学的なパラメータを導入し、新世代型バイオマーカーの miRNA と組み合わせる事で従来困難であった正確な NASH 発症予測を目指す。体組成計測機器は比較的安価で全国の健診、医療機関に広く普及し多数の受検者から膨大な体組成データが集積されており、血清 miRNA 測定も自動化・迅速化の開発が進んでいる。従って本研究で提案する斬新な診断法の導入で全国の健診センター、臨床栄養部での体組成計測と連携して我が国の膨大な数の NAFLD 症例から嚴重フォロー・解析すべき高リスク群を正確に絞り込み、当該分野の研究が飛躍的に進歩する事が予想される。更に NAFLD/NASH に最も重篤な合併症である肝細胞癌についても上記手法の適用により高リスク群の選別と早期診断・治療の道が拓ける。

### 3. 研究の方法

研究は以下の(I)～(III)の3段階で順次あるいは一部同時進行で進めていく。

(I) NAFLD/NASH患者の体組成分類と血清miRNAの網羅的解析：(令和2年度)

体組成計測

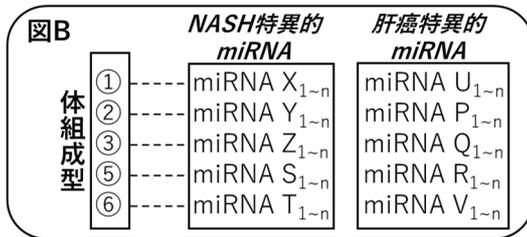


当施設で病理診断された NAFLD/NASH 患者 50 名 (NASH25 名, 非 NASH25 名) で定期栄養指導の際に 8 点



電極法を用いた生体電気インピーダンス法で体組成計測を行い体脂肪率と筋肉量を測定し右表のように 9 分類する。予備実験から患者は 5 型に分類できると予想され、各体組成型の患者保存血清 (診断時) から miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて miRNA を含む RNA 試料を精製する。この試料を専用キットで蛍光標識し (Ambion 社, mirVana™ miRNA labeling kit)、約 2600 種の miRNA を搭載したオリゴチップ (東レ, Human miRNA Oligo chip-4 plex) にハイブリダイゼーションした後、miRNA 解析専用スキャナー (東レ, 3D-Gene Scanner 3000, 当教室で現有) でスキャンする。各 miRNA 対応の蛍光強度データから全 miRNA 発現プロファイルを専用の解析サーバと統計手法 (SAM, RDAM) で解析する (図

		筋肉量		
		低 → 高		
体脂肪率	高			
	低			



A),

協力者正木と共同で 5 型それぞれの NASH 非 NASH 間で全種の miRNA 発現パターンを比較解析し、体組成型別に NASH 特異的に強発現する miRNA 分子種を同定する (図 B)。

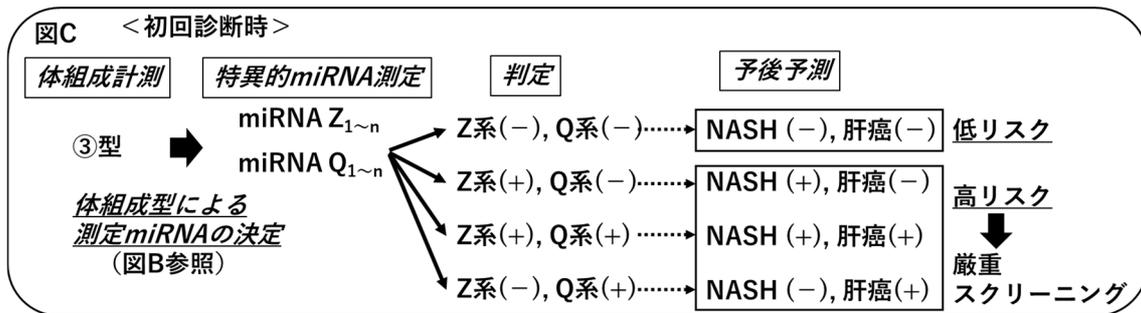
(II) 体組成計測と血清miRNA解析によるNASH発症予測アルゴリズムの構築：(令和2-3年度)

当施設で過去に病理学的に非 NASH と診断されたが活動性肝炎が 3 年以上持続し臨床的に NASH への移行が危惧され、2 回目の肝生検・病理診断を実施した NAFLD 症例において体組成型を判定した上で初回診断時の保存血清について (I) で判明した体組成型別に特異的な miRNA の発現を測定し 2 回目の病理診断結果と照合する。一定数の症例が蓄積できた段階で各種解析ソフトを駆使して全データを解析し、体組成判定と特定の miRNA 発現量測定を用いた NASH 発症予測アルゴリズムを作成する (図 C)。上記の様な症例の NASH 発症率が当施設の過去のデータから 2~3 割である事と過去の文献による血清 miRNA を用いた疾患検出力を考慮するとアルゴリズム作成に必要な症例数は各体組成型に夫々 10 症例と計算している。

(III) 本予測システムの肝発癌予測への応用：(令和3 - 4年度)：

当施設では毎年新規 10 例以上の NAFLD/NASH 背景の肝細胞癌を治療しており、3 年前からはその全例で栄養指導と体組成計測を実施している。そこで過去および本研究期間内に集積した肝発癌症例の保存血清で網羅的 miRNA 解析を行い非発癌症例と比較し、

(I), (II)と同様の手順で体組成型ごとに肝発癌予測に有用な miRNA を同定し(図 B)、体組成計測と特定の miRNA 発現量測定を組み合わせた予測アルゴリズムを構築する(図 C)。最後に NASH および肝発癌それぞれの予測アルゴリズムの差異と独立性を調べ、両アルゴリズムの併用により臨床的に問題となっている「NASH を経由しない NAFLD の肝発癌」を予測可能かどうか検証する。



#### 4. 研究成果

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の中から肝関連死亡が多い非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の高危険群を選別する簡便な診断法開発を目指し、体組成計測と血清マイクロRNA(miRNA)測定を組み合わせたNASH発症予測法の確立を目指した。

当施設で病理診断されたNAFLD/NASH患者(各20名、合計40名がエントリー)に生体電気インピーダンス法で体組成計測を行うと同時に患者血清を保存し、後日各血清miRNAを網羅的に解析した。体組成は5種類に分類され、各群のNASH-非NASH間で各miRNAの発現強度を比較した所、NASH症例で特異的に発現強度が変化しているmiRNA分子種が複数同定できた。具体的にはいずれの体組成型においても発現が増加しているmiRNAが13分子、減少しているmiRNAが7分子同定できた。これらの分子種を用いて全症例を分析したところ、特定の体組成型(上記方法論における 型)と増加するmiRNA4分子+減少するmiRNA3分子の組み合わせが、NASHの進展度合い(肝線維化程度および肝発癌)と非常に相関が強い事が証明できた。さらにNASH発症、進展の予測アルゴリズム作成に挑んだが、残念ながら研究機関内には完成しなかった。現在精力的に解析を継続中です。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoneyama Hirohito, Morishita Asahiro, Iwama Hisakazu, Fujita Koji, Masaki Takahiro, Tani Joji, Tadokoro Tomoko, Nomura Takako, Sakamoto Teppei, Oura Kyoko, Takuma Kei, Nakahara Mai, Mimura Shima, Deguchi Akihiro, Tsutsui Kunihiro, Himoto Takashi, Shimotohno Kunitada, Wakita Takaji, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu	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 2021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

1. 著者名 Nomura K, Kitanaka A, Iwama H, Tani J, Nomura T, Nakahara M, Ohura K, Tadokoro T, Fujita K, Mimura S, Yoneyama H, Kobara H, Morishita A, Okano K, Suzuki Y, Tsutsi K, Himoto T, Masaki T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Association between microRNA-527 and glypican-3 in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letter	6. 最初と最後の頁 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12490	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

1. 著者名 Yoneyama Hirohito, Morishita Asahiro, Iwama Hisakazu, Fujita Koji, Masaki Takahiro, Tani Joji, Tadokoro Tomoko, Nomura Takako, Sakamoto Teppei, Oura Kyoko, Takuma Kei, Nakahara Mai, Mimura Shima, Deguchi Akihiro, Tsutsui Kunihiro, Himoto Takashi, Shimotohno Kunitada, Wakita Takaji, Kobara Hideki, Masaki Tsutomu	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

1. 著者名 Kohno Tomoki, Morishita Asahiro, Iwama Hisakazu, Fujita Koji, Tani Joji, Takuma Kei, Nakahara Mai, Oura Kyoko, Tadokoro Tomoko, Nomura Takako, Yoneyama Hirohito, Kato Kiyohito, Okano Keiichi, Suzuki Yasuyuki, Nishiyama Akira, Himoto Takashi, Masaki Tsutomu	4. 巻 20
2. 論文標題 Comprehensive analysis of circulating microRNAs as predictive biomarkers for sorafenib therapy outcome in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11696	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

1. 著者名 Nomura Kei, Kitanaka Akira, Iwama Hisakazu, Tani Joji, Nomura Takako, Nakahara Mai, Ohura Kyoko, Tadokoro Tomoko, Fujita Koji, Mimura Shima, Yoneyama Hirohito, Kobara Hideki, Morishita Asahiro, Okano Keiichi, Suzuki Yasuyuki, Tsutsi Kunihiko, Himoto Takashi, Masaki Tsutomu	4. 巻 21
2. 論文標題 Association between microRNA?527 and glypican?3 in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 229 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12490	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hirohito Yoneyama, Toshiaki Nakatsu, Naohito Uchida, Yuuko Bandou, Asahiro Morishita, Joji Tani, Koji Fujita, Takako Nomura, Teppei Sakamoto, Shima Mimura, Tomoko Tadokoro, Kyoko Oura, Mai Nakahara, Kei Takuma, Akihiro Deguchi, Takashi Himoto, Tsutomu Masaki
2. 発表標題 Prediction of Liver Fibrosis and Carcinogenesis by Body Comparison Analysis by Bioelectrical Impedance Analysis
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver: APASL Oncology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米山弘人、岩間和久、森下朝洋、谷丈二、野村貴子、藤田浩二、田所智子、大浦杏子、三村志麻、中原麻衣、琢磨慧、坂本鉄平、出口章広、樋本尚志、正木勉
2. 発表標題 DAA治療によるウイルス排除後にも肝炎が持続あるいは再燃するC型肝炎患者の血清マイクロRNAの解析
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
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
研究 分担者	岩間 久和  (Iwama Hisakazu)  (20398035)	香川大学・医学部・准教授   (16201)	
研究 分担者	正木 勉  (Masaki Tsutomu)  (30335848)	香川大学・医学部・教授   (16201)	

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
---------	---------