

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21692

研究課題名（和文）脂肪肝由来エクソソームに着目した肝線維化予防のための革新的検査法の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative test method for prevention of liver fibrosis focusing on fatty liver-derived exosomes

研究代表者

千葉 満（Chiba, Mitsuru）

弘前大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：20583735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究成果によって、NASH誘発マウスにおいてmiR-122-5p、miR-192-5p、miR-22-3pは肝臓で発現が減少し、血清中で増加したことから、これらのmiRNAは肝細胞障害によって肝細胞から血中へ漏出したことが予想された。一方、miR-342-3p、miR-34a-5p、miR-7118-5pは肝臓・血清中で共に発現が増加しており、これらのmiRNAは細胞内発現亢進による分泌増加が予想された。これらのmiRNAは新規NASHバイオマーカーの有力な候補となる可能性が示唆された。今後これらのmiRNAのうち、線維化マーカーとなる血清中miRNAの有用性について検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではNASHの早期診断を目指した新たな血清中miRNAバイオマーカー候補を複数同定した。これらが将来初期NASH診断バイオマーカーとして利用されれば、脂肪肝患者が初期の肝線維化状態に進展しているかどうか、今後肝生検が必要であるか、などの定量評価が可能となる。早期のNASH診断により肝硬変や肝癌への進展予防が可能となるため、肝疾患の予防医学での臨床的意義が非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The results of this study showed that miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-22-3p were decreased in the liver and increased in the serum in NASH-induced mice, suggesting that these miRNAs leaked from hepatocytes into the blood due to hepatocyte injury. On the other hand, miR-342-3p, miR-34a-5p, and miR-7118-5p were upregulated in both liver and serum, suggesting that these miRNAs were upregulated in secretion due to increased intracellular expression. These miRNAs may be promising candidates for novel NASH biomarkers. In the future, we will examine the usefulness of serum miRNAs as fibrosis markers among these miRNAs.

研究分野：臨床検査

キーワード：脂肪肝 NASH バイオマーカー microRNA エクソソーム 肝線維化 非アルコール性脂肪性肝炎 リキッドバイオプシー

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) は肝炎ウイルスやアルコール摂取が関与しない、炎症、脂肪沈着、肝線維化を伴った病態のことである。NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) の 10~20% が NASH であり、治療介入がない場合は 5~10 年で 5~20% の症例が肝硬変に進行する。NASH は単純性脂肪肝とは異なり肝硬変・肝癌への進展リスクがあるため病態の早期発見が求められている。

NASH の早期診断に様々な画像検査が検討されている。超音波画像は脂肪沈着の有無、CT では肝脾 CT 値を用いて脂肪沈着の量を評価できるが、炎症や線維化の判定は困難であるため、初期 NASH の鑑別には使用できない。また腹部 MRI 検査は肝臓への脂肪蓄積を脂肪沈着の組成まで鋭敏に評価できるが、撮像に時間を要し、NASH と非 NASH を鑑別することはできない。さらに超音波エラストグラフィは NASH 線維化の Stage 判定には有用だが、NASH 診断や鑑別には有用ではない。このように画像検査における NASH 診断や線維化の評価にはまだ課題が多く残されている。

一方、NASH 診断に血液検査の利用も検討されている。NAFLD では AST 値、ALT 値の軽度上昇例が多いが、トランスアミナーゼ値の上昇は通常の脂肪肝でもみられる所見である。それゆえ、AST・ALT 値は NASH 特異的な所見とはいえず、進展度の評価にも用いられないため、あくまで肝障害のスクリーニングに留まる。また NASH は将来線維化の懸念があるため、線維化進展予測スコアリングシステムが検討されている。NAFLD fibrosis score や FIB4 index が線維化予測に有用であることが報告されているが、線維化の早期予測には向いていない。現時点では一般的な血液生化学検査やスコアリングによる NAFLD・NASH の診断は難しく、NAFLD・NASH の確定診断には肝生検組織診断が必要である。しかし、肝生検組織診断は侵襲性が高いため、侵襲性の低い新たな NAFLD・NASH 検査法の確立が求められている。

マイクロ RNA (miRNA) は遺伝子発現の調節機能を持つ 21~25 塩基程度の 1 本鎖 RNA である。近年、細胞内に存在する miRNA の一部が細胞外に放出されて体液中に存在することが明らかになった。これらの miRNA は細胞外小胞内やタンパク質と結合した状態で存在しており、多くの疾患の診断マーカーとなり得ることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、NASH を誘発するモデルマウスを用いて、NASH 発症前および初期時に血清中で増減し、NASH バイオマーカーとなる可能性をもった血清中 miRNA とその由来について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

< 実験動物 >

5 週齢の C57BL/6NJcl の雄マウスを日本クレア株式会社から購入した。1 週間順化させたのちに実験に使用した。NASH モデル動物を作成するため、動物飼料にコリン欠乏高脂肪飼料 (メチオニン減量、0.1% メチオニン添加) (CDAHFD) (リサーチダイエツト社、品番 A06071302) を使用した。Control 群には食育繁殖固型飼料 CE-2 (日本クレア社) および水道水を自由に摂取させ、NASH 群には CDAHFD および水道水を自由に摂取させた。本実験は弘前大学動物実験委員会からの承認をもとに行い、吸入麻酔液イソフルラン (ファイザー社) による麻酔下で行った。

< 肝臓組織からの肝細胞と肝非実質細胞の分離 >

麻酔下のマウスを腹側正中線切開により肝臓および門脈域を露出させ、門脈経由で前灌流液 (70mL, 7ml/min) 次に HBSS perfusion (70mL, 7ml/min) を流した後、肝臓を取り出して 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNase HBSS を入れたシャーレ内で肝臓を細断した。次に 37 °C で 10 分間振盪し、ナイロンガーゼ、100 μm と 70 μm のメッシュフィルターで濾過し、単離細胞懸濁液を得た。単離細胞懸濁液を 50 G で 3 分間遠心し、沈殿に 10 ml の PBS を加え再び遠心した。PBS による洗浄を 3 回行い、得られた細胞沈殿を肝細胞画分とした。単離細胞懸濁液を 50 G で 3 分間遠心した上清はさらに 500 G で 5 分間遠心し、得られた細胞沈殿を肝非実質細胞画分とした。

< RNA 抽出 >

マウスから肝臓組織および血清を回収し、ISOGEN II (ニッポンジーン社) を使用して RNA を抽出した。肝臓 RNA 濃度は Nano Drop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific 社) にて測定した。血清 RNA 濃度は Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit (ThermoFisher Scientific 社) を用いて測定した。

< miRNA マイクロアレイ >

miRNA Complete Labeling and Hyb kit (Agilent Technologies 社) を使用して血清 RNA 2.5 ng を Cy3 標識した。方法は説明書に従って行った。Cy3 標識 miRNA を miRNA マイクロアレイスライド (SurePrint G3 Mouse miRNA Rel.21.0、Agilent Technologies 社) と 55 °C、20 rpm、20 時間インキュベーションしハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、スライドの洗浄作業を行った。Cy3 蛍光シグナルを SureScan マイクロアレイスキャナーで蛍光を検出し、Future Extraction software (Agilent Technologies 社) による数値化処理を行った。遺伝子発現解析は GeneSpring GX14.5 software (Agilent Technologies 社) にて行った。

< リアルタイム PCR >

TaqMan MicroRNA RT Kit (ThermoFisher Scientific 社) および TaqMan MicroRNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) を使用して microRNA 由来 cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR は StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (ThermoFisher Scientific 社) を使用し、95 °C、15 秒、60 °C、1 分の条件下で 40 サイクル反応を行った。内部補正には U6 snRNA を使用した。

4 . 研究成果

< NASH 発症マウス肝臓における miRNA 発現 >

飼料摂取 1、2、6 週のマウス肝臓に対し miRNA マイクロアレイ解析を行った (表 1)。摂取 1 週の NASH 群のマウス肝臓では、control 群と比較し 1.5 倍以上発現が上昇した miRNA は 8 種あり、低下した miRNA は 24 種あった。摂取 2 週では発現上昇は 9 種、低下は 47 種あり、摂取 6 週では発現上昇は 12 種、低下は 40 種あった。これらの中で、摂取 1、2、6 週全てに発現が見られた miRNA は 26 種であり、このうち発現が上昇したのは 4 種、低下したのは 22 種あった。また、miR-342-3p と miR-34a-5p は経時的に発現が上昇していることが明らかとなった。

	1w	2w	6w		1w	2w	6w
mmu-let-7g-5p	-1.65	-2.85	-2.43	mmu-miR-30a-5p	-1.51	-2.40	-2.01
mmu-miR-101a-3p	-1.51	-4.63	-4.18	mmu-miR-30b-5p	-1.52	-2.83	-2.41
mmu-miR-101c	-1.59	-5.55	-4.97	mmu-miR-30c-5p	-1.83	-2.51	-2.46
mmu-miR-122-3p	-1.99	-5.11	-4.54	mmu-miR-30e-5p	-1.56	-2.93	-2.21
mmu-miR-122-5p	-1.95	-2.87	-2.86	mmu-miR-342-3p	2.72	4.44	6.79
mmu-miR-192-5p	-1.83	-3.87	-3.99	mmu-miR-34a-5p	3.28	6.03	10.37
mmu-miR-193a-3p	-1.62	-2.60	-2.72	mmu-miR-365-3p	-1.62	-2.35	-2.25
mmu-miR-194-5p	-1.79	-3.07	-3.26	mmu-miR-3963	-2.06	-2.83	-2.21
mmu-miR-19b-3p	-1.53	-3.87	-3.09	mmu-miR-3968	-1.98	-3.15	-2.61
mmu-miR-223-3p	2.61	2.43	2.97	mmu-miR-5100	-2.32	-3.12	-2.49
mmu-miR-22-3p	-2.10	-2.34	-2.49	mmu-miR-6366	-2.05	-1.66	-2.22
mmu-miR-26b-5p	-1.61	-3.25	-2.80	mmu-miR-6368	-2.06	-1.52	-2.32
mmu-miR-30a-3p	-1.66	-2.37	-2.31	mmu-miR-7118-5p	1.66	9.94	3.62

表 1. NASH モデルマウスにおける肝臓 miRNA 発現変化

Control 群の肝臓に比べて NASH 群の肝臓で発現が 1.5 倍以上変化した 26 種の miRNA の fold change を示す。

< NASH 発症マウス血清における miRNA 発現 >

飼料摂取 1、2、6 週のマウス血清に対し miRNA マイクロアレイ解析を行った(表 2)。摂取 1 週の NASH 群のマウス血清では、control 群と比較し 1.5 倍以上発現が上昇した miRNA は 15 種あり、低下した miRNA は 9 種あった。摂取 2 週では発現上昇は 21 種、低下は 2 種あり、摂取 6 週では発現上昇は 27 種、低下は 20 種あった。これらの中で、摂取 1、2、6 週全てに発現が見られた miRNA は 12 種あり、このうち発現が上昇したのは 8 種、低下したのは 4 種あった。また、肝臓と同様に miR-342-3p と miR-34a-5p は経時的に発現が上昇していることが判明した。

	1w	2w	6w
mmu-miR-122-5p	11.81	26.58	15.67
mmu-miR-133a-3p	-2.30	-3.03	-7.49
mmu-miR-133b-3p	-2.27	-2.97	-7.64
mmu-miR-140-3p	-1.65	-1.97	-1.52
mmu-miR-192-5p	6.83	8.60	7.27
mmu-miR-21a-5p	3.55	2.85	2.62
mmu-miR-22-3p	1.56	2.11	2.39
mmu-miR-342-3p	2.47	3.03	8.03
mmu-miR-34a-5p	2.62	5.28	8.26
mmu-miR-486a-5p	-1.64	-2.54	-3.56
mmu-miR-6931-5p	2.97	2.79	11.00
mmu-miR-7118-5p	1.88	1.54	2.13

表 2. NASH モデルマウスにおける血清中 miRNA 発現変化

Control 群の血清に比べて NASH 群の血清で発現が 1.5 倍以上変化した 12 種の miRNA の fold change を示す。

< 肝臓と血清で共通に発現する miRNA >

肝臓 miRNA 26 種、血清 miRNA 12 種のうち共通していたのは 6 種の miRNA であった。この 6 種のうち、miR-122-5p、miR-192-5p、miR-22-3p の 3 種は肝臓では発現が低下し、血清中では発現が増加した。一方、miR-342-3p、miR-34a-5p、miR-7118-5p の 3 種は肝臓、血清ともに発現の増加が確認された。このように、前者と後者では発現の挙動が異なっており、それぞれ由来が違う miRNA である可能性が示唆された。

< 肝細胞および肝非実質細胞における miRNA の発現 >

肝細胞および肝非実質細胞における miRNA の発現を解析するため、miR-34a、miR-122、miR-192 を対象にリアルタイム PCR をおこなった(図 1)。Control 群の発現を 1 とした場合、NASH 群での

miR-34a の発現量は肝臓全体では 1.94 倍、肝細胞では 2.02 倍、肝非実質細胞では 2.09 倍の発現量があり、肝細胞でも肝非実質細胞でも発現が上昇することが明らかになった。次に、Control 群の発現を 1 とした場合、NASH 群での miR-122 の発現量は肝臓全体では 0.49 倍、肝細胞では 0.28 倍、肝非実質細胞では 1.11 倍の発現量があり、肝非実質細胞ではあまり変化がなく、肝細胞で発現が低下することが明らかとなった。さらに Control 群の発現を 1 とした場合、NASH 群での miR-192 の発現量は肝臓全体では 0.45 倍、肝細胞では 0.21 倍、肝非実質細胞では 0.91 倍の発現量があり、肝非実質細胞ではあまり変化がなく、肝細胞で発現が低下していた。これらの結果から、miR-122、miR-192 は肝細胞に由来し、miR-34a は肝細胞、肝非実質細胞の両方に由来することが予想された。

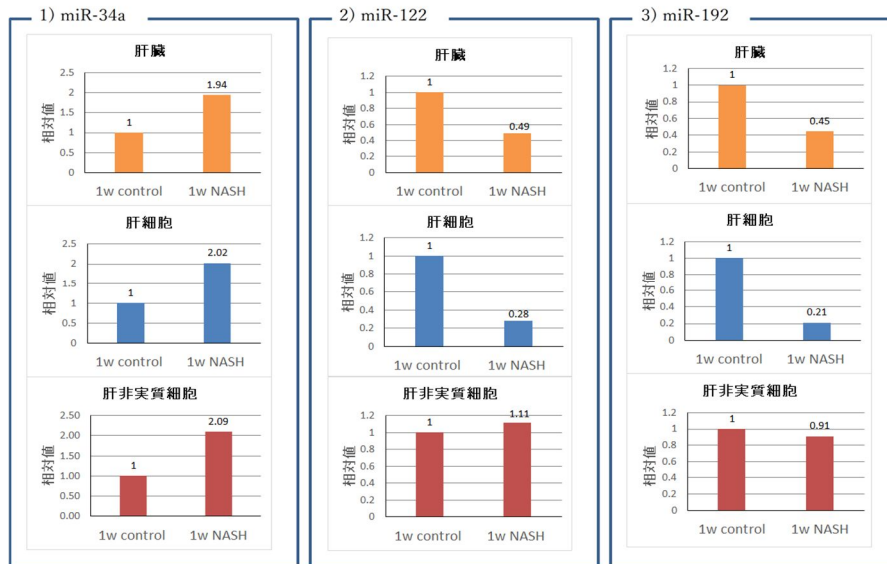


図 1. 肝細胞および肝非実質細胞における miRNA の発現解析

これまでの報告で、miR-122 は脂肪性肝炎のマウス肝細胞において有意に発現減少し、肝臓における miR-122 の発現減少は、エクソソームに富む血清画分およびタンパク質に富む血清画分の両方において、循環 miR-122 の上昇と関連することが報告されている。また、NAFLD 患者を対象に行われた研究では、miR-122、miR-192、miR-34a が脂肪症および炎症活性との相関することが報告されている。本研究結果は、肝臓で発現が減少し血清中で発現が増加していた miR-122、miR-192、miR-22 の 3 種に関して、肝臓への過剰な脂肪沈着により肝細胞障害が起こり、その結果 AST や ALT などの逸脱酵素のように肝細胞から漏出し、血清中で発現が増加したことを示唆していると考えられる。これらの miRNA は、NASH の病態のひとつである肝臓脂肪化における炎症を初期段階から評価し得るマーカーとなり得ることが期待される。

一方、これまでに miR-34a は肝脂質代謝に関与することが示唆されている。それゆえ、肝臓と血清共に発現が増加していた miR-342、miR-34a、miR-7118 の 3 種に関しては、NASH の病態進行とともに、肝細胞や肝非実質細胞で発現が増加し、その結果体液中への分泌が亢進することによって、血清中で発現が増加することが示唆された。また、miR-342 および miR-34a は肝臓と血清でともに発現が上昇しており、血清中のこれらの miRNA の動態を観察することによって肝臓の状態を間接的に知り得るバイオマーカーとしての有用性が期待される。今後はより精度の高い肝細胞分離方法を確立し、これらの miRNA がどの構成細胞に由来するかを明らかにするとともに、NASH の病態進行との相関性を明らかにしていくことが求められると考える。また、線維化に関わる血清中 miRNA も同定しており、今後線維化バイオマーカーとしての有用性について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本佳菜, 千葉満
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎における血清中マイクロRNAバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本佳菜, 田山千紗, 大杉悠平, 加藤弓子, 林百音, 千葉満
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の新規バイオマーカーとしての血清中マイクロRNAの探索
3. 学会等名 日本医療検査科学会第52回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤哲, 大杉悠平, 松本佳菜, 千葉満
2. 発表標題 ヒト肝臓癌細胞株HepG2を使用したin vitro脂肪滴形成モデルにおける遺伝子発現変化と機能解析
3. 学会等名 日本医療検査科学会第52回大会
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
---------	---------