

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460706

研究課題名(和文)新規非アルコール性脂肪肝バイオマーカーとしての血清micro-RNAの評価

研究課題名(英文)Evaluation of serum micro-RNA as a new biomarker for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

研究代表者

寺平 良治 (TERADAIRA, Ryoji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・名誉教授

研究者番号：80087668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血清micro-RNA-122(miR-122)が、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)の新たな臨床検査のバイオマーカーとなる可能性について評価した。高脂肪食を与えたNAFLDのモデル動物を作製して、発症過程(2、6、10週間)におけるmiR-122と関連物質の経時的変化を測定した。その結果、本実験のNAFLD発症条件は緩和であった。現在のNAFLDのバイオマーカーである血清アミノトランスフェラーゼ活性は上昇しないにも関わらず、血清miR-122は脂肪投与後2、6、10週間に顕著に上昇した。血清miR-122は、早期NAFLDの優れた新たなバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared the utility of serum miR-122 with routine clinical chemistry at consecutive time points during the onset of NAFLD using high-fat diet (HFD)-induced NAFLD model rats. To clarify changes in serum levels of miR-122 during development of NAFLD, experimental rats were fed a HFD for 2-10 weeks, while control rats received standard chow. Over the 10 weeks of feeding, body weight, total liver lipids, and liver and serum triacylglycerol were increased in the HFD group compared to the control group. However, no significant changes in serum alanine aminotransferase activity were observed, suggesting that NAFLD status was mild. In contrast, we observed drastic up-regulation of circulating miR-122 levels. Circulating miR-122 level might be superior to clinical markers traditionally used to monitor hepatic disease.

研究分野：臨床検査学

キーワード：非アルコール性脂肪肝(NAFLD) 血清miR-122 バイオマーカー 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

近年、日本では非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) がメタボリックシンドロームと深く関連することから早期発見が重要であると考えられている。しかし、簡易的なマーカーは無いのが現状である。申請者は、NAFLD の検査マーカーとして血清 micro-RNA(miR) に注目し、ヒト血清 miR-122 が NAFLD になると有意に上昇することを明らかにした。そこで本研究では、血清 miR-122 についての、新規 NAFLD のバイオマーカーとしての評価を行うこととした。

2. 研究の目的

血清 miR-122 の新規 NAFLD バイオマーカーとしての可能性について評価することを目的とした。

具体的には、NAFLD 発症過程での血清 miR の変動を経時的に捉えるために NAFLD モデル動物を作製し、血清 miR-122 がいつ、どのような段階で上昇してくるのか? どの程度の肝組織障害を反映するか? 従来の肝疾患バイオマーカーとの比較等、病態との関連性等を解明する事を目的とした。

NAFLD の発症機序としては、肥満発症と同様に脂肪過剰摂取や酸化ストレス、SNPs などがあげられるが、詳細なメカニズムは不明である。また NAFLD 発症までの miR-122 の時間的な変化については未知である。miR-122 は脂質代謝に関連するとの報告もあることから、血清 miR-122 と発症・進展機序との関連について検討するために関連パラメーターを測定することとした。病態解析は肝組織での脂肪沈着、血清・肝組織中の各種パラメーターと miR-122 等について、経時的な分析を行った。

3. 研究の方法

(1)モデル動物の作製

動物は 1 週間の予備飼育した SD ラットを用いた。予備飼育した一部は負荷実験前対照とした(負荷 0 週、n=6)。NAFLD モデルとしては、高脂肪食を摂取させたラットで作製した。高脂肪食群(HFD、n=18)には、高脂肪食(エネルギー比 35%)を負荷し、負荷後 2、6、10 週後の各時点(n=6)で殺し、血清、肝組織を採取した。また対照群は通常食摂取ラットを用いた(Control、n=18)。Control 群も同様に実験開始後 2、6、10 週後の各時点(n=6)で殺し、血清、肝組織を採取した。さらに毎週各群の体重を測定した。

(2)各種パラメーターの測定

負荷前、負荷後の各時点における血清、組織中の各種パラメーターを測定し、その経時変化を追跡した。

各種パラメーターとしては総脂質、中性脂肪(TG)、総コレステロール(Cholesterol)、遊離脂肪酸(NEFA)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノ

トランスフェラーゼ(ALT)を自動分析機で測定した。また肝臓中の過酸化脂質(LPO)は Ohkawa らの方法で測定した。

(3)miR-122 の測定

miR-122 の測定において、血清中 miRNAs の分離には TRIzol を、肝組織からの RNAs の抽出には miRNeasyMini kit を用いた。負荷前、負荷後の各時点における血清、組織中の測定には quantitative real-time PCR を用い、miR-122 は CT 法 (2^{-CT}) で相対比レベルとして表現した。

(4)肝組織中の脂肪観察

高脂肪摂取過程の各経過時点において、採取した肝組織は 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋切片を作製、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色をした。また一部の組織は凍結切片を作製し、脂肪蓄積の経時変化をオイルレッド O 染色で観察した。

(5)統計処理

統計には JMP ver.9.0 を使用した。有意差検定には Mann-Whitney U test を使い、 $p < 0.05$ を有意とした。血清 miR-122 と肝 TG・LPO の相関検定には Spearman's rank correlation coefficient を用いた。

4. 研究成果

(1)モデル動物の体重

高脂肪食を摂取した HFD 群の体重は、10 週間飼育期間中 Control 群に比べて上昇していった。

(2)各種パラメーターの解析

HFD の血清・肝組織の総脂質、血清・肝臓の TG が、各経過時点において Control 群に比べて上昇した。

血清 Cholesterol、血清 NEFA については、各経過時点において両群の間に有意な変動はなかった。

ALT、AST は、各経過時点において HFD 群と Control 群の間に有意な変動はなく、本実験条件下における NAFLD からのアミノ基転移酵素活性への影響は見られなかった。

肝 LPO には、各経過時点において HFD 群と Control 群の間に有意な変動はなかった。

これらのことから、本実験条件における NAFLD は、肝組織の損傷や炎症発生以前の緩和な状態であることが示唆された。

(3)miR-122 の解析

血清中の miR-122 については、HFD 群では高脂肪食摂取 2 週間後で Control 群に比べて顕著な上昇(約 5 倍)がみられ、6、10 週間ではさらに上昇した(図 1A)。それに対して肝組織中の miR-122 については、2、6 週間後で Control に比べて顕著な減少を示した。10 週間後の肝 miR-122 については両群間で有意差はなかった(図 1B)。(引用文献より引用)

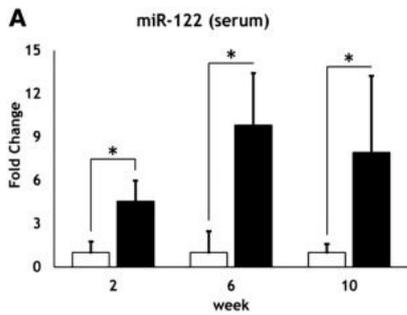


図 1 A . 高脂肪食摂取 (HFD) ラットと対照ラットにおける 2、6、10 週間後の血清中の miR-122 レベルの変動

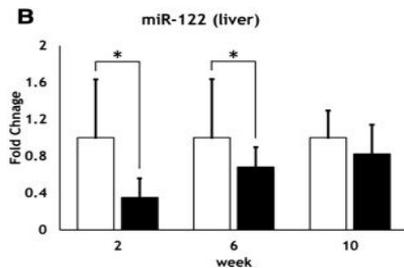


図 1 B . 高脂肪食摂取 (HFD) ラットと対照ラットにおける 2、6、10 週間後の肝組織中の miR-122 レベルの変動

(4) 肝組織中の脂肪蓄積の解析

肝組織のオイルレッド O 染色では、Control 群では各経過時点において脂肪沈着は観察されなかった。それに対して HFD 群では高脂肪食摂取 2 週間後から脂肪沈着が認められ、6、10 週間後はさらに強く認められた (図 2)。(引用文献 より引用)

これらの脂肪染色の結果と、血清・肝組織の総脂質、血清・肝臓の TG などのパラメーターが上昇したことから、本動物モデルは高脂肪食により誘発された NAFLD のモデルとなることが確認された。

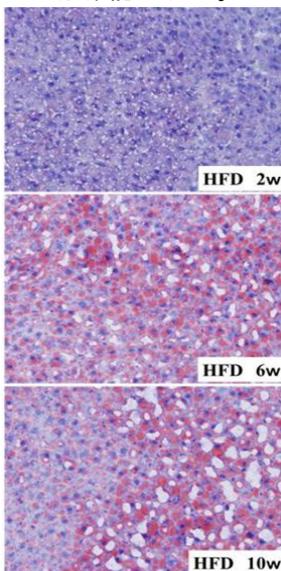


図 2 . 高脂肪食摂取 (HFD) ラット 2、6、10 週間後の肝組織切片のオイルレッド O 染色の変化

次に、NAFLD 発症・進展機序と血清 miR-122 の関連性を検討した。血清中の miR-122 の顕著な上昇が肝の TG と LPO の蓄積に因っているのかについて確認するために、血清 miR-122 と肝 TG、血清 miR-122 と肝 LPO の間の相関性を調べた。その結果、共に有意な相関性を示した。なお、我々は本研究の予備実験においても、オレイン酸を添加した HuH-7 細胞の培養液中に miR-122 量が上昇する結果が得られている。

このことから、NAFLD モデルラットにおける血清 miR-122 の上昇は、高脂肪食により誘発された緩和な NAFLD の肝組織に由来する可能性が示唆された。

本研究の結果から、以下のことが明らかになった。

本研究の NAFLD モデルラットの条件は、従来のバイオマーカーである血清アミノ基転移酵素が上昇する段階以前の、肝傷害や炎症が起こる前の緩和な条件である。

本条件下でも血清 miR-122 が顕著に上昇する。

血清 miR-122 の測定は、早期の NAFLD を検出する新規の簡易なバイオマーカー検査として有用であることが示唆される。

高価で煩雑な超音波や CT 検査などとは異なり、受診し易い簡易な臨床化学検査として期待できる。

< 引用文献 >

Hiroya Yamada, Koji Suzuki, Naohiro Ichino, Yoshitaka Ando, Akira Sawada, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, Koji Ohashi, Ryouji Teradaira, Takashi Inoue, Nobuyuki Hamajima, Shuji Hashimoto. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. Clinica Chimica Acta, 446, 267-271, 2015.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Hiroya Yamada, Koji Ohashi, Koji Suzuki, Eiji Munetsuna, Yoshitaka Ando, Mirai Yamazaki, Hiroaki Ishikawa, Naohiro Ichino, Ryouji Teradaira, Shuji Hashimoto. Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. 査読有、Clinica Chimica Acta, 446, 267-271, 2015.

DOI: org/10.1016/j.cca.2015.05.002

[学会発表] (計 38 件)

Mirai Yamazaki, Koji Suzuki, Hiroya Yamada, Koji Ohashi, Naohiro Ichino,

Hiroaki Ishikawa, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, Eiji Nubetsuna, Genki Mizuno, Kanako Kondo, Takashi Inoue, Ryoji Teradaira. Serum levels of miR-20a and miR-27a are associated with NAFLD in general Japanese population: the Yakumo study. 21st IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EUROMEDLAB PARIS 2015 Program 81p (Abstract S235), June 21-25, 2015, Paris, France

Mirai Yamazaki, Hiroya Yamada, Yoshitaka Ando, Koji Ohashi, Koji Suzuki, Naohiro Ichino, Hiroaki Ishikawa, Nao Taromaru, Ayuri Nagura, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, Takashi Inoue, Nobuyuki Hamajima, Ryoji Teradaira. Associations between circulating microRNAs miR-20a or miR-27a and non-alcoholic fatty liver disease in a general Japanese population: the Yakumo study. IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) WorldLab Istanbul 2014 Program 108p, June 22-26, 2014, Istanbul, Turkey.

Koji Ohashi, Hiroya Yamada, Koji Suzuki, Naohiro Ichino, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, Yoshitaka Ando, Akira Sawada, Hiroaki Ishikawa, Ryoji Teradaira. Association of Serum miR-122 Levels with Subcutaneous Fat among Japanese Subjects. 13th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress (13thAPFCB) Programme & Abstracts 128p, October 27-30, 2013, Bali, Indonesia.

Hiroya Yamada, Koji Suzuki, Naohiro Ichino, Yoshitaka Ando, Akira Sawada, Keisuke Osakabe, Keiko Sugimoto, Koji Ohashi, Ryoji Teradaira, Takashi Inoue, Nobuyuki Hamajima, Shuji Hashimoto. Serum miR-122 as Potential Biomarker for Non-alcoholic Fatty Liver. 13th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress (13thAPFCB) Programme & Abstracts 126p, October 27-30, 2013, Bali, Indonesia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺平 良治 (TERADAIRA Ryoji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・名誉教授

研究者番号：80087668

(2) 研究分担者

大橋 鉦二 (OHASHI Koji)

藤田保健衛生大学・大学院保健学研究科・

教授

研究者番号：60278281