

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461006

研究課題名(和文) B型肝炎におけるマイクロRNAを用いた肝線維化マーカーの開発

研究課題名(英文) MicroRNA as a liver fibrosis marker in chronic hepatitis B

研究代表者

榎本 大(Enomoto, Masaru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20423874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：B型慢性肝疾患35例の肝生検において線維化ステージF1 vs F2-4またはF1/F2 vs F3/F4またはF1-3 vs F4の比較を行ったところ、肝線維化進展例において変動する傾向のあるmiRNAはいくつか得られたが、統計学的有意差に至るものはなかった。IL28b、ITPA遺伝子型による比較を行ったところ、後者について有意に発現の異なるmiRNAが約60個見つかった。そのうちの少なくとも複数のmiRNAではリアルタイムPCRでも発現量に有意差を認めた。肝組織の発現量と相関を認めた複数の血液中miRNAの抗ウイルス治療中の変化について、PEG-IFN治療中には有意な変化を示すものもあった。

研究成果の概要(英文)：In liver biopsy samples obtained from 35 patients with chronic hepatitis B, differences in some microRNA (miRNA) expressions were found between F1 and F2-4, between F1/F2 and F3/F4, and between F1-3 and F4, but not significantly. Regarding the IL28b and ITPA genotypes, about 60 miRNA expressions were significantly up- or down-regulated depending on the latter genotypes, some of which showed significant differences also in real-time PCR analysis. Some of circulating miRNA expressions, which were correlated with miRNA in liver, significantly changed during PEG IFN treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：B型慢性肝炎 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)感染者は世界に約3億5千万人存在し、肝硬変、肝癌の主要原因として重要である。近年の治療の進歩によりC型肝炎では高率にウイルス排除が得られるようになったが、B型肝炎ではインターフェロン(IFN)の奏効率も20~30%に留まっている。核酸アナログ治療は、長期投与が必要で、長期投与により薬剤耐性が問題となる。

肝炎ウイルスの持続感染は肝臓における慢性的な壊死・炎症を惹起し、それに対する非実質細胞(肝星細胞、筋線維芽細胞など)による修復と実質細胞(肝細胞)の再生が、肝線維化と肝発癌に繋がると考えられる。これまで肝線維化の評価は肝生検により行われてきたが、侵襲的であり反復検査は不可能である。

マイクロRNA(miRNA)は20~25塩基ほどの1本鎖のnon-coding RNAであり、相補的なメッセンジャーRNA(mRNA)との結合により翻訳を阻害する又はmRNAの分解を惹き起こすことにより遺伝子発現を抑制する。血中miRNAはRNaseからの分解を免れ安定した状態で存在し、バイオマーカーとして利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

今回、我々はB型慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織、血液中で、肝線維化の進展に伴って変動し、肝線維化マーカーとなりうるmiRNAを同定することを目的として、マイクロアレイ、リアルタイムPCRを用いて研究をおこなった。

3. 研究の方法

1) 肝組織におけるmiRNA発現の解析

B型慢性肝炎・肝硬変35例(男性17例/女性18例、平均41±13歳、ALT中央値108IU/L、HBVDNA7.0±2.0Logコピー/mL、genotypeA/B/C1/4/30、IL28bTT24例)の肝生検組織よりmirVana miRNA isolation kit(Applied Biosystems)を用いてRNAを抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1(東レ)を用いてmiRNA発現の網羅的解析を行なった。有意に変動したmiRNAについては、TaqMan MicroRNA Assay(Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRによる定量的解析を行った。

2) 肝組織と血液中のmiRNAの比較

miRNAの発現は臓器別に異なったプロファイルを持っているが、肝組織では全miRNAの約70%がmiR-122であり、炎症や肝の恒常性に重要な役割を果たしている。血液中での変動が肝組織での変動を反映するものがあれば、非侵襲的バイオマーカーとして利用価値が高いと考えられる。そこで肝組織において肝線維化の進展に伴って変動するmiRNAが、血液中でも同様の変化を示すか否か検討した。

3) 抗ウイルス治療中の血中miRNAの変化

対象症例のうち9例にはPEG-IFN-2a 180µg週1回48週投与、15例には核酸アナログ(エンテカビル12例、テノホビル3例)が投与された。これらの症例に関しては、治療中の増減についても検討した。

4) B型肝炎とC型肝炎のmiRNA発現の比較

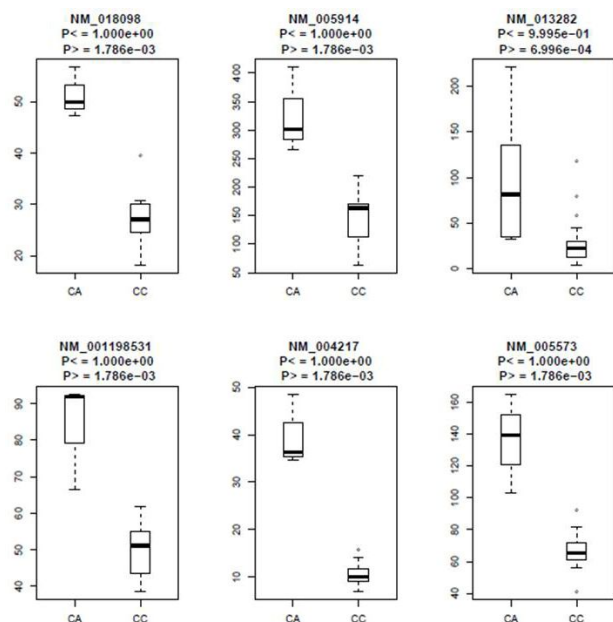
B型肝炎において変動するmiRNAが、我々の先行研究によりC型肝炎において変動すると報告したmiRNAと同一か否か検討した。

4. 研究成果

1) 対象患者35例のうち肝生検による線維化ステージはF1 28例/F2 5例/F3 1例/F4 1例であった。そこでF1 vs F2-4またはF1/F2 vs F3/F4またはF1-3 vs F4の比較を行ったところ肝線維化進展例において、上昇または低下する傾向のあるmiRNAはいくつか得られたが、統計学的有意差に至るものはなかった。

2) 次に男性 vs 女性、高齢 vs 若齢、ALT高値 vs ALT低値、高HBVDNA量 vs 低HBVDNA量、genotype C vs non-Cなど様々な比較を行ったが、有意に変動するmiRNAを見出すことは出来なかった。そこでIFNの効果や病態進展に関連すると報告されているIL28b遺伝子型、治療誘発性の貧血に関連すると報告されているITPA遺伝子型による比較を行ったところ、後者について有意に発現の異なるmiRNAが約60個見つかった。

そのうちの少なくとも複数個のmiRNAではリアルタイムPCRでも発現量に有意差を認め(下図)、かつ肝組織と血液中の発現量の間にも有意な相関を認めた。



3) 肝組織の発現量と相関を認めた複数個の血液中 miRNA の抗ウイルス治療中の変化について、PEG-IFN 治療中には有意な変化を示すものもあった。一方、核酸アナログ治療中には miRNA の有意な変動は観察されなかった。

4) 以前、我々が C 型肝炎において肝線維化とともに有意に変動すると報告した miR-222/miR-221 その他の miRNA について (Ogawa T, Enomoto M, et al. *Gut* 2012) は、マイクロアレイ、リアルタイム PCR とともに解析を行ったが、有意な変化は観察されなかった。

以上より、現在のところ B 型慢性肝炎・肝硬変患者の肝組織、血液中において、肝線維化の進展に伴って変動し、肝線維化マーカーとなりうる miRNA を同定することは出来ていない。そのひとつの要因として、今回解析した患者群の中に線維化進展例の割合が低いことが挙げられる。出血傾向のみられる肝線維化進展例では、肝生検を避ける傾向があり、今後は肝がん切除標本の非がん部も対象に加えるのなどして研究を継続してゆきたい。また、C 型肝炎において有意な変動を呈した miRNA でも B 型肝炎では差がみられなかったことに関して、これも症例数の関係かもしれないが、B 型と C 型では肝内 miRNA プロファイルは異なるという報告 (Ura et al. *Hepatology* 2009) もあることから、B 型肝炎特有のマーカーを探索することは重要である。

一方、宿主の遺伝子型によって発現の異なる miRNA が複数見つかったことは興味深い。現在のところ、その意義については不明であるが、*IL28b* 遺伝子、*ITPA* 遺伝子については、C 型肝炎において多数の報告があるものの、B 型肝炎における研究は限られており、今後の検討課題と考える。また、B 型肝炎において、より重要と思われる HLA についても、今後検討する必要がある。

また PEG-IFN 治療と核酸アナログ治療では、血中の miRNA の変化に差が観られたことも重要である。PEG-IFN は HBsAg の低下に優れ、核酸アナログは HBV DNA の低下に優れるなど、両者はその特性が大きく異なる治療薬であり、その優劣を単純に比較することはできないとされている (日本肝臓学会 B 型肝炎治療ガイドライン第 2.2 版 2016 年 5 月)。B 型肝炎症例の治療に当たっては、B 型肝炎の自然経過、及び PEG-IFN と核酸アナログ製剤の薬剤特性をよく理解し、個々の症例の病態に応じた方針を決定する必要があるが、肝組織および血液中の miRNA 発現解析はその一助になる可能性があり、今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kozuka R, Hayashi T, Kohmoto MT, Jomura H, Morikawa H, Murakami Y, Shiomi S, Kawada N. Long-term outcome of sequential therapy with lamivudine followed by interferon- α in nucleoside-naïve, hepatitis B e-antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. *J Interferon Cytokine Res.* 2015; 35: 613-20、査読有り。

Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 12031-8、査読有り。

Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi YH, Azuma T. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray. *PLoS One.* 2014;9:e106314、査読有り。

Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014; 29: 1715-21、査読有り。

Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. *J Gastroenterol.* 2013; 48: 999-1005、査読有り。

Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kobayashi S, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Kawada N. Entecavir and interferon- α sequential therapy in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol.* 2013; 48: 397-404、査読有り。

[学会発表](計 8 件)

Enomoto M, Tamori A, Kozuka R, Uchida-Kobayashi S, Fukunisi S, Tsuda Y, Higuchi K, Saito M, Enomoto H, Nishiguchi S, Kawada K. Sequential therapy with short-

term entecavir followed by interferon in chronic hepatitis B patients. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). 2016年2月20-24日(グランドプリンスホテル新高輪[東京都港区])

榎本大, 田守昭博, 河田則文. エンテカビル効果不良の難治性 B 型慢性肝疾患の特徴とその対策. 第51回日本肝臓学会総会 PD4. 2015年5月21-22日(ホテル日航熊本他[熊本市中央区])

Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Jomura H, Shiomi S, Kawada N. Long-term outcome of sequential therapy with lamivudine followed by interferon in nucleoside-naïve, HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). 2015年3月12-15日(Istanbul, Turkey)

榎本大, 西口修平, 河田則文. HBeAg陽性 B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ/IFN sequential 治療後の長期経過: 特に HBsAg, HBcrAg の変化について. 第100回日本消化器病学会総会 WS8. 2014年4月23-26日(東京国際フォーラム[東京都千代田区])

村上善基, 棚橋俊仁, 田口善弘, 豊田秀徳, 熊田卓, 榎本大, 田守昭博, 河田則文. 次世代シークエンサーによる肝発癌に關与する miRNA の網羅的解析. 第100回日本消化器病学会総会. 2014年4月23-26日(東京国際フォーラム[東京都千代田区])

Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Jomura H, Shiomi S, Kawada N. Long-term outcome of sequential therapy with lamivudine followed by interferon in nucleoside-naïve, hepatitis B e-antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 2014年4月9-13日(London, UK)

榎本大, 田守昭博, 河田則文. B 型慢性肝炎に対する PEG-IFN の早期抗ウイルス効果: Sequential 療法も含めて. 第17回日本肝臓学会大会 PD2. 2013年10月9-10日(グランドプリンスホテル新高輪他[東京都港区])

河田則文, 小川智弘, 榎本大, 藤井英

樹, 村上善基, 吉里勝利, 池田一雄. 慢性肝疾患における肝線維化バイオマーカーとしての miR-222 の有用性. 第50回日本臨床分子医学会学術集会. 2013年4月12-13日(東京国際フォーラム[東京都千代田区])

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/hepatology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 大 (ENOMOTO, MASARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 20423874

(2) 研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI, YOSHIKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00397556

河田 則文 (KAWADA, NORIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30271191

田守 昭博 (TAMORI, AKIHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30291595

(3) 連携研究者

なし