

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461520

研究課題名(和文) 宿主と微生物のmiRNAを介したクロストークの解析

研究課題名(英文) An analysis of miRNA related host-microbial crosstalk

研究代表者

長谷川 直樹 (Hasegawa, Naoki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20198724

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)：慢性難治性呼吸器感染症である肺Mycobacterium avium complex(MAC)症の疾患活動性の指標となるバイオマーカーの発見、病態解明および新規治療標的の発見を目的として、我々は、肺MAC症に関連するmicro RNA(miRNA)を探索した。

肺MAC症患者と健常者の血清中miRNAプロファイルを比較することで、肺MAC症に関連するmiRNAとしてhsa-miR-346を発見した。今後、hsa-miR-346と肺MAC症の疾患活動性との関連を更に明確にし、病態解明そして新しい治療への応用を目指していく。

研究成果の概要(英文)：To figure out the pathophysiology and find biomarkers reflecting disease activity and new therapeutic targets for Mycobacterium avium complex (MAC) pulmonary disease, which is an intractable chronic respiratory infection, we searched micro RNAs (miRNAs) associated with MAC pulmonary disease.

By comparing the profile of serum miRNAs of the patients with that of healthy controls, we determined hsa-miR-346 as a miRNA associated with MAC pulmonary disease. We will evaluate whether this miRNA is a biomarker reflecting disease activity and perform further studies to figure out the pathophysiology of MAC pulmonary disease associated with hsa-miR-346 for novel treatment.

研究分野：感染症内科

キーワード：感染症

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)

我が国において、肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症は、肺非結核性抗酸菌症のうち約 90% を占め、増加の一途をたどっている。現在、肺 MAC 症の疾患活動性は、喀痰の採取状況や検査法が結果に影響する“排菌状態”、定量的評価が困難な“画像所見”を総合して評価されている。そのため、肺 MAC 症の疾患活動性を客観的に評価することは極めて困難であり、疾患活動性の客観的かつ定量的な評価や治療方針の判断に有用なバイオマーカーが求められている。

### (2)

近年、血清マイクロ RNA (miRNA) の疾患バイオマーカーとしての可能性が検討されている。miRNA は様々な方法で遺伝子発現の下方制御を行うことが知られている。2002 年に初めて疾患との関連が示されて以降、特に腫瘍領域で研究が進み、miRNA が発癌の指標として利用しうる可能性が示唆された。2007 年には、エキソソーム内に miRNA や mRNA が存在し、エキソソームが miRNA の細胞間輸送に利用されている可能性が報告され、2008 年には病変組織から血中に放出された腫瘍特異的 miRNA を測定することによって具体的なバイオマーカー利用への可能性が示唆され、侵襲性の少ない検査法への応用としてさらに miRNA に注目が集まっている。

## 2. 研究の目的

肺 MAC 症の疾患活動性の指標となるバイオマーカーの発見、更に、病態解明および新規治療標的の発見を目的として、肺 MAC 症に関連する miRNA (肺 MAC 症関連 miRNA) を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1)

慶應義塾大学医学部倫理委員会承認の下、診断が確定した無治療肺 MAC 症患者 (患者群) 9 名、患者群と性別・年齢・BMI がマッチした健常者 (健常者群) 9 名より得られた血清を用いて、東レ社 3D-Gene® Human miRNA (miRNA 検出用オリゴ DNA プローブ) による網羅的 miRNA 解析を行う。患者群と健常者群の血清 miRNA プロファイルを比較し、肺 MAC 症関連 miRNA の候補となる miRNA を抽出する。

### (2)

慶應義塾大学医学部倫理委員会承認の下、診断が確定した無治療肺 MAC 症患者 (患者群) 16 名と患者群と性別・年齢・BMI がマッチした健常者 (健常者群) 16 名の血清を用いて、「研究の方法 (1)」で抽出した肺 MAC 症関連 miRNA 候補をリアルタイム PCR 法にて定量する。患者群と健常者群の血清 miRNA 量を比較し、肺 MAC 症関連 miRNA としての妥当性を評価する。

### (3)

ヒト末梢血単核球 (PBMC) 由来のマクロファージに MAC104 株を感染させ、リアルタイム PCR 法により細胞上清中の hsa-miR-346 濃度を測定する。

## 4. 研究成果

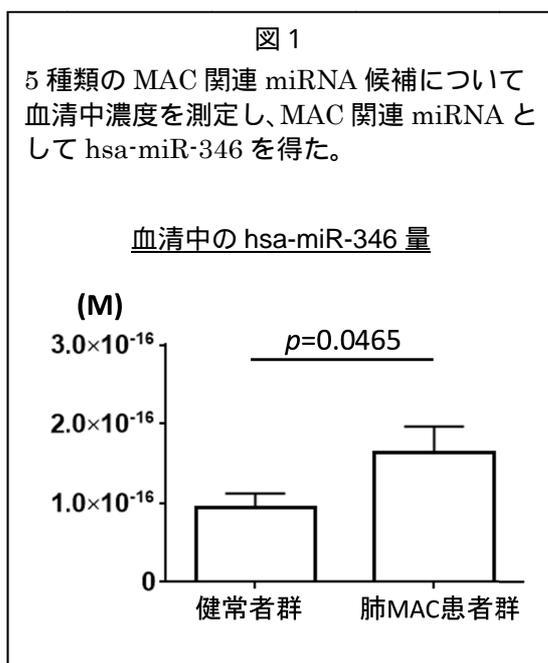
### (1)

患者群と健常者群の網羅的血清 miRNA 解析により、健常者群に比べて患者群で統計学的に有意に増加している血清 miRNA を 5 種類抽出し、これらを肺 MAC 症関連 miRNA の候補とした。

### (2)

リアルタイム PCR 法を用いた測定により、

5種類のMAC関連miRNA候補について、健常者群と患者群それぞれの血清中濃度値を得た。これら5種類の肺MAC症関連miRNA候補の中から、血清中濃度が健常者群に比べて患者群で統計学的に有意に高いmiRNAとして、hsa-miR-346を抽出した(図1)。



以上より、血清 hsa-miR-346 を肺 MAC 症関連 miRNA と判断した。

(3)

ヒトPBMC由来のマクロファージにMAC104株を感染させ、リアルタイムPCR法を用いて細胞上清中のhsa-miR-346濃度を測定したところ、MAC未感染マクロファージの上清中のそれに比べ、有意に高かった。

以上より、MACがマクロファージに感染し、細胞外にhsa-miR-346が分泌され、その一部が血液中を循環している可能性が示唆された。hsa-miR-346の先行研究等より、免疫担当細胞、気道上皮細胞を介した肺MAC症の病態に、hsa-miR-346が関与している可能性が推測される。

(4)

今後、hsa-miR-346と肺MAC症の疾患活動性との関連を更に明確にし、同時にhsa-miR-346の生物学的機能を解析していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Nishimura T, Fujita-Suzuki Y, Mori M, Carpenter S, Fujiwara H, Uwamino Y, Tamizu E, Yano I, Kawabe H, Hasegawa N. Middle-aged to elderly women have a higher asymptomatic infection rate with Mycobacterium avium complex, regardless of body habitus. *Respirology*. 査読あり,21(3):553-5,2016, DOI:10.1111/resp.12699.
2. Asakura T, Ishii M, Kikuchi T, Kameyama K, Namkoong H, Nakata N, Sugita K, Tasaka S, Shimizu T, Hoshino Y, Okamoto S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Disseminated Mycobacterium marinum Infection With a Destructive Nasal Lesion Mimicking Extranodal NK/T Cell Lymphoma: A Case Report. *Medicine*. 査読あり,95(11),2016, DOI: 10.1097/MD.0000000000003131.
3. Asakura T, Funatsu Y, Ishii M, Namkoong H, Yagi K, Suzuki S, Asami T, Kamo T, Fujiwara H, Uwamino Y, Nishimura T, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Health-related quality of life is inversely correlated with C-reactive protein and age in Mycobacterium avium complex lung disease: a cross-sectional analysis of 235 patients. *Respiratory Research*. 査読あり

- 16(1):145,2015,DOI:  
10.1186/s12931-015-0304-5.
4. Asakura T, Ishii M, Haraguchi M, Kamiyama I, Kohno M, Sakamaki H, Emoto K, Hayashi Y, Sugiura H, Kawada I, Soejima K, Namkoong H, Tasaka S, Hasegawa N, Betsuyaku T. Dry pleurisy complicating solitary pulmonary nodules caused by Mycobacterium avium: a case report. Journal of Medical Case Reports. 査読あり,9:238, 2015, . DOI: 10.1186/s13256-015-0723-4.
  5. Namkoong H, Tasaka S, Akiyama M, Yagi K, Ishii M, Suzuki K, Kohno M, Hasegawa N, Takeuchi T, Betsuyaku T, Successful resumption of tocilizumab for rheumatoid arthritis after resection of a pulmonary Mycobacterium avium complex lesion: a case report. BMC Pulmonary Medicine. 査読あり,15:126,2015, DOI: 10.1186/s12890-015-0130-z.
  6. Namkoong H, Fukumoto K, Hongo I, Hasegawa N. Refractory tenosynovitis with 'rice bodies' in the hand due to Mycobacterium intracellulare. Infection, 査読あり,43:1-2,2015.
  7. Nishimura T, Fujita-Suzuki Y, Yonemaru M, Ohkusu K, Sakagami T, Carpenter SM, Otsuka Y, Namkoong H, Yano I, Hasegawa N. Recurrence of disseminated Mycobacterium avium complex disease in a patient with anti-gamma interferon autoantibodies by reinfection. Journal of Clinical Microbiology. 査読あり,53(4):1436-8, 2015, DOI: 10.1128/JCM.03339-14.
  8. Yagi K, Ishii M, Namkoong H, Asami T, Fujiwara H, Nishimura T, Saito F, Kimizuka Y, Asakura T, Suzuki S, Kamo T, Tasaka S, Gono T, Kamei K, Betsuyaku T, Hasegawa N. Pulmonary nocardiosis caused by Nocardia cyriacigeorgica in patients with Mycobacterium avium complex lung disease: two case reports. BMC Infectious Diseases. 査読あり, 14(1):684,2014 ,DOI: 10.1186/s12879-014-0684-z.
- [学会発表](計 10 件)
1. 長谷川直樹 Non-Tuberculosis Mycobacterium Infection Non-Tuberculosis Mycobacterium infection in Japan. 第 27 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 仙台国際センター(宮城県・仙台市),2016 年 1 月 29 日~1 月 31 日.
  2. 長谷川直樹 非結核抗酸菌症：現状とその課題. 日本内科学会関東支部主催第 53 回生涯教育講演会 日本都市センター(東京都・千代田区),2015 年 12 月 12 日.
  3. 長谷川直樹 非結核性抗酸菌症の最近の話題. 第 33 回呼吸器・免疫シンポジウム 海運クラブ(東京都・千代田区),2015 年 9 月 21 日.
  4. 長谷川直樹 I G R A を用いた結核感染診断の進歩と課題. 第 214 回日本呼吸器学会関東地方会 秋葉原コンベンションホール(東京都・千代田区),2015 年 5 月 23 日.

5. 長谷川直樹 抗酸菌感染症に対する治療戦略. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 東京国際フォーラム(東京都・千代田区),2015 年 4 月 23 日~25 日.
6. 長谷川直樹 NTM 診療マニュアルの概要と臨床への応用. 第 90 回 日本結核病学会総会 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市),2015 年 3 月 27 日.
7. 長谷川直樹 非結核性抗酸菌症は生物製剤使用の禁忌か. 第 90 回 日本結核病学会総会 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市),2015 年 3 月 27 日.
8. 長谷川直樹 非結核性抗酸菌症の診断と治療. 第 148 回 日本呼吸器内視鏡学会関東地方会 東京医科大学病院臨床大講堂(東京都・新宿区),2014 年 3 月 29 日.
9. 長谷川直樹 ER 診療に役立つ感染対策: 抗酸菌感染症. 第 169 回 ICD 講習会 第 41 回 日本救急医学会総会・学術集会 東京国際フォーラム(東京都・千代田区), 2013 年 10 月 23 日.
10. 長谷川直樹 呼吸器感染症の病態生理と免疫応答: 非結核性抗酸菌症. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 東京国際フォーラム(東京都・千代田区),2013 年 4 月 19 日.

〔図書〕(計 3 件)

1. 工藤翔二, 倉島篤行, 伊藤穰, 酒井文和, 小宮幸作, 平松美也子, 川上聡, 四元秀毅, 牛島真一郎, 八十川直哉, 福永健太郎, 南宮湖, 長谷川直樹. 克誠堂出版,

日本胸部臨床,2015,105(1084-1094).

2. 君塚善文, 田坂定智, 南宮湖, 長谷川直樹. 南江堂, 肺 MAC 症診療 Up to Date - 非結核性抗酸菌症のすべて. 2013,259(141-146).
3. 舘田一博, 渡邊治雄, 奥村昌夫, 四津里英, 舩津 洋平, 長谷川直樹. 大道学館出版部, 日本臨床別冊感染症症候群(上) 病原体別感染症編. 2013,812(236-239)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 抗酸菌症又は抗酸菌感染のバイオマーカー

発明者: 長谷川直樹, 西村知泰

権利者: 慶應義塾大学, ニコン

種類: 特許

番号: 特許願 2016-030020

出願年月日: 平成 28 年 2 月 19 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 直樹 (HASEGAWA, Naoki)

慶應義塾大学・医学部 教授

研究者番号: 2 0 1 9 8 7 2 4

(2)研究分担者

星野 仁彦 (HOSHINO, Yoshihiko)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ

ー 感染制御部・室長

研究者番号: 2 0 5 6 9 6 9 4

(3)研究協力者

西村 知泰 (NISHIMURA, Tomoyasu)  
慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・  
講師  
研究者番号：90348649