

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09895

研究課題名（和文）血清マイクロRNAを用いたANCA関連血管炎における新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of new biomarker for ANCA associated vasculitis using serum micro RNA

研究代表者

佐田 憲映（Ken-ei, Sada）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70423308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現を調節する蛋白の一つであるマイクロRNAは自己免疫疾患において診断や活動性のバイオマーカーとなることが期待されている。本研究ではANCA関連血管炎におけるマイクロRNAの有用性について検討をした。網羅的検索にて候補となったmiR-5571、miR-200cについて臨床パラメータとの比較検討を行い、miR-5571はMPO-ANCAと有意な関連を認め疾患特異的な診断マーカーとなる可能性が、またmiR-200cは疾患活動性のマーカーとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-5571は疾患特異的な診断マーカー、miR-200cは疾患活動性のマーカーとなることが示唆された。これらのマイクロRNAのさらなる検討によってANCA関連血管炎の病態解明や臨床的なバイオマーカーとしての利用により、有効かつ安全な治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：MicroRNA, adjusting genome expression, is expected as biomarker of diagnosis or activity in autoimmune diseases. In this study, we evaluated usefulness of microRNA in ANCA associated vasculitis. We found on miR-5571 and miR-200c based on comprehensive search. We found that miR-5571 associated with MPO-ANCA positivity and miR-200c related with disease activity statistically.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：ANCA関連血管炎 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体 Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) 関連血管炎は、小血管(細小動静脈・毛細血管)の壊死性血管炎と高い ANCA 陽性率を共通の特徴とする全身性血管炎疾患群である。ANCA 関連血管炎の診断においては組織学的診断に加え血液中の ANCA の存在が重要となるものの、偽陽性を呈する症例や ANCA 陰性の血管炎症例も稀ではない。同様に高度な炎症所見を呈する病態として感染症との鑑別に難渋する場合も少なくなく、ANCA 関連血管炎の診断・活動性評価のための疾患特異的かつ疾患活動性を反映し病態にも関与する新規バイオマーカーの発見が強く望まれている。

non-coding RNA の一種である microRNA は様々な mRNA の 3' UTR (非翻訳領域)の相補的配列に結合し標的 mRNA の安定性や蛋白への翻訳を阻害することで遺伝子発現を調節しており、近年、microRNA と自己免疫疾患の関連が明らかとなりつつある。関節リウマチ患者においては、末梢血単核球および滑膜組織での miR-146 の発現の増加などが報告され、さらに miR-223 のサイレンサーを導入することで、コラーゲン誘導性関節炎(CIA: collagen induced arthritis) モデルマウスの関節破壊抑制効果が認められるなど、新たな治療標的となる可能性も示唆されている。

これまで自己免疫疾患に関連した microRNA の報告では、組織や細胞における発現が検討されてきた。しかし、血清中において microRNA などの核酸が RNase に破壊されることなく安定して存在することが明らかとなり、血清中の microRNA が診断や活動性評価のバイオマーカーとして注目されている。また、血液中に分泌された microRNA は標的細胞に取り込まれレシピエント細胞における遺伝子発現の制御にも関与する。しかし ANCA 関連血管炎は自己免疫疾患の中でも患者数が少ない疾患であり microRNA の報告は殆ど行われていない。

我々はこれまでに少数の検体を用いて行った網羅的解析において、健常対照と比較して活動期 ANCA 関連血管炎患者血清において miR-5571・miR-200c の濃度が上昇していることを確認した。さらに血清から miRNA を含む total RNA を抽出して RT-PCR を施行したところ、血清中のこれらの発現が健常血清や感染症患者の血清と比較して有意に亢進していることを確認した。miR-200c は ZEB1(Zinc finger E-box-binding homeobox 1)や ZEB2 などの標的蛋白の発現を抑制し上皮間葉転換を制御し組織の修復や線維化に関与することが知られている。また、miR-5571 の標的遺伝子にはいくつかの Zinc finger protein が知られており、それらは Zc3h12 を介して血管内皮細胞の NFκB 活性化を抑制し血管の炎症を抑制することが報告されていることから、単なるバイオマーカーとしての役割だけではなく、血管炎の病態そのものにもこれらの microRNA が関与している可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

ANCA 関連血管炎患者の治療前後における miR-5571・miR-200c の変動と臨床的なパラメータとの関連を検討し活動性評価法を開発する。次に、別の ANCA 関連血管炎患者の血清で活動性指標としての有用性の検証を行う。

## 3. 研究の方法

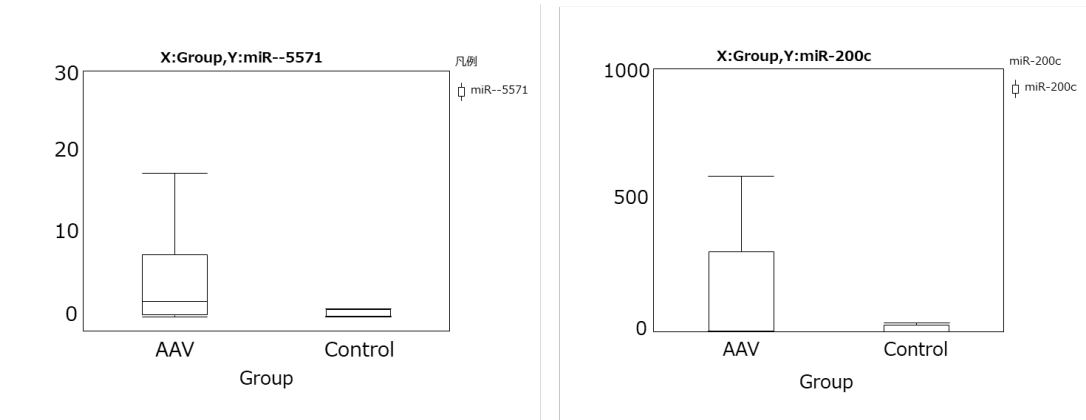
ANCA 関連血管炎患者例の治療開始前の miR-5571・miR-200c をリアルタイム PCR 法で検討し、疾患活動性スコア(Birmingham Vasculitis Activity Score)との相関について確認する。miR-5571・miR-200c それぞれの血中濃度と治療開始前の患者背景(疾患分類、重症度、臓器別 BVAS, CRP, MPO-ANCA, PR3-ANCA, 血清クレアチニン, 白血球数, IgG, KL-6)との関連を単回帰あるいは重回帰分析を用いて個別のパラメータとの関連を明らかにする。

次に、miR-5571・miR-200c の治療前後の血中濃度の変化と臨床的パラメータとの関連を検討する。それぞれの治療前後の血中濃度の比および差と臨床的評価(寛解・非寛解・再燃)との関連を単変量・多変量解析を用いて評価する。また併せて CRP や ANCA 値、血清クレアチニン、白血球数、IgG の変化などとの関連も統計学的に検討を行う。ROC 曲線を用いて miR-5571・miR-200c の活動性予測のための最適なカットオフ値を設定し、活動性予測性能を評価する。

## 4. 研究成果

ANCA 関連血管炎(AAV)患者の治療開始前および健常人での miR-5571・miR-200c をリアルタイム PCR 法で測定し、AAV 患者で miR-5571 の発現が亢進していることを確認した(miR-5571, p=0.002; miR-200c, p=0.38; 図 1)。

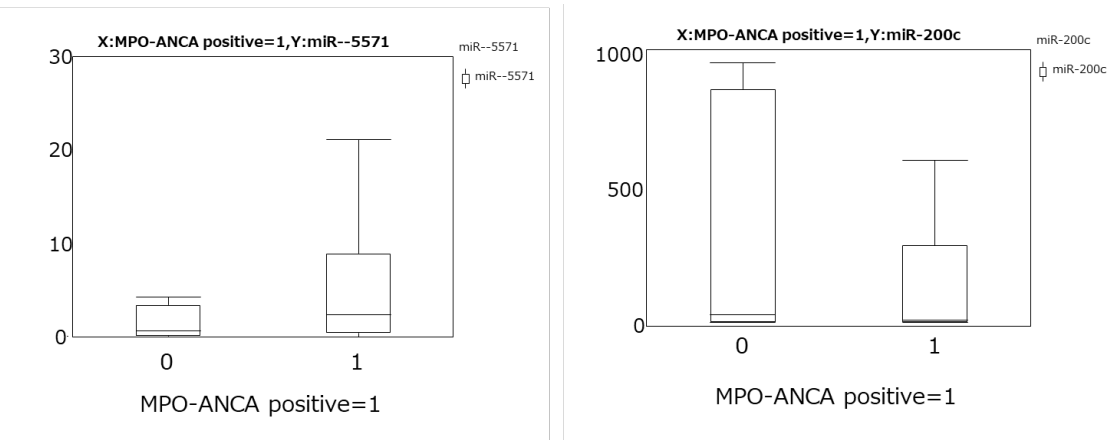
図 1



次に、活動性の AAV 患者における miR-5571・miR-200c と患者背景（疾患分類，重症度，臓器別 BVAS（バーミンガム血管炎活動性スコア），CRP, MPO-ANCA, PR3-ANCA, 血清クレアチニン，白血球数, IgG ,KL-6）との関連を単回帰あるいは重回帰分析を用いて個別のパラメータとの関連を検討したが、miR-5571・miR-200c の発現と疾患分類、BVAS、臓器障害、CRP との関連は認めなかった。

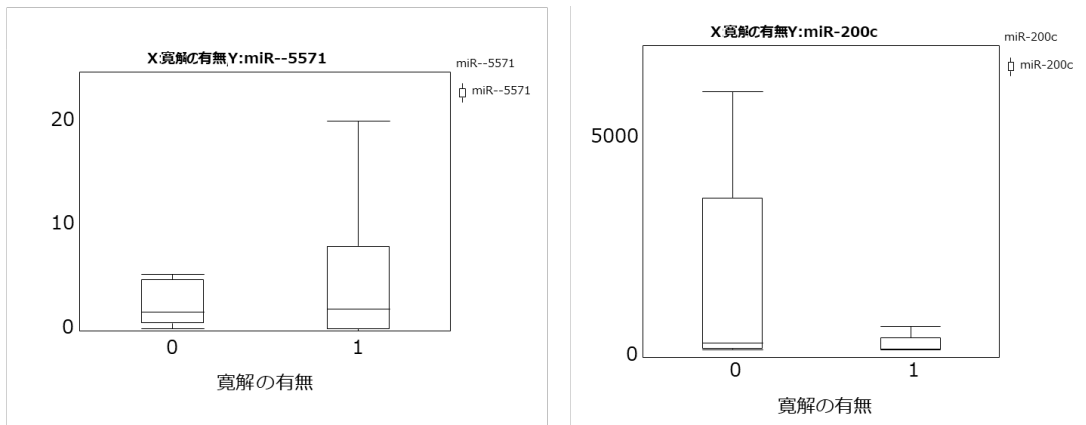
miR-200c は欠損値として扱わざるを得ない検体が多く十分な検討ができなかったが、miR-5571 と MPO-ANCA 値で有意な相関を認めた。（図 2）。

図 2



次に、活動性症例および寛解症例での検討を行ったところ miR-5571 は活動性による差を認めなかったが miR-200c は活動性症例と比較し寛解例で有意な低下を認めた（図 3）。

図 3



しかし、統計学的な有意差は得られたものの、いずれの検討でも測定値にばらつきが多く、バイオマーカーとしての有用性には課題が残ると考えられた。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：勝山 隆行

ローマ字氏名：KATSUYAMA TAKAYUKI

研究協力者氏名：渡辺 晴樹

ローマ字氏名：WATANABE HARUKI

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、研究者個人に帰属されます。