

令和元年6月13日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08946

研究課題名(和文) 血中micro-RNAを用いたNAFLDのスクリーニングマーカーの開発

研究課題名(英文) A circulating microRNA signature as noninvasive biomarkers for NAFLD

研究代表者

寺平 良治 (Teradaira, Ryoji)

藤田医科大学・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、日本でもNAFLDになる予備軍が1000万人いると言われており、メタボリックシンドロームと深く関与すること、NAFLDは非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を経て肝硬変や肝がんへと移行することから早期発見は重要課題となっている。しかし、NAFLDの簡易的な診断マーカーはない。我々の研究成果として、miR122とmiR27aがNAFLDの病態を反映する。さらに、この2つmiRNAの組み合わせ(miR122/miR27a比)による新規スクリーニング検査法を確立し、実際の健康診断受診者を対象にスクリーニング検査としての有用性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、日本では非アルコール性脂肪肝(N AFLD)になる予備軍が1000万人いると言われており、早期発見が強く望まれている。NAFLDの診断は、軽度の脂肪化例ではその感度は決して高くなく、ALT値も正常値を示す例があり、NAFLDの拾い上げに有用なパラメータの確立が必要である。本研究では、血中miRNAを利用することにより、NAFLDをスクリーニングする検査法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is closely associated with obesity, metabolic syndrome, and type II diabetes mellitus. Recently, circulating microRNAs (miRNAs) have been proposed as useful disease biomarkers. We examined whether circulating miRNAs, such as miR-20a, miR-27a, and miR-122, were useful biomarkers for NAFLD. We conducted a cross-sectional analysis of 527 subjects aged 39 years or older who had undergone a health examination in the general people. Serum miR-20a, miR-27a, and miR-122 levels were measured by quantitative real-time PCR. Serum levels of miR-20a and miR-122a were significantly associated with NAFLD subjects. Serum miR-27a levels were significantly lower NAFLD subjects. On the other hand, miR-122 level were significantly higher NAFLD subjects. In conclusion, circulating miR-27a and miR-122 levels were significantly associated with NAFLD subjects. Combination of circulating miR-27a and miR-122 may be useful biomarkers for NAFLD.

研究分野：臨床検査

キーワード：microRNA NAFLD バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、日本でも NAFLD になる予備軍が 1000 万人いると言われており、メタボリックシンドロームと深く関与すること、NAFLD は非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を経て肝硬変や肝がんへと移行することから早期発見は重要課題となっている。しかし、NAFLD の簡易的な診断マーカーはない。さらに炎症を起こした NASH では診断の確定にはバイオプシーによる肝組織診断 (肝生検) が唯一の検査法であり、検診で容易にできる検査法の開発が強く望まれている。

micro-RNA (miRNA) は標的 mRNA に結合して翻訳阻害を引き起こす。最近の研究で血液中に miRNA が安定的に存在することが示された。血中 miRNA は安定性があり、侵襲性も低く、高い感度・特異度を有するなどバイオマーカーとして有用な特徴が多くある。これまでに癌を中心として多くの疾患や病態により変動する有望な血中 miRNA が同定された。これら血中 miRNA は、早期発見や病態把握について既存のバイオマーカーの成績を上回っており、臨床応用が期待されている。実際、「がん」や「アルツハイマー型認知症」などの疾患では健康診断などで活用され始めている。2012 年より申請者らは、NAFLD の新規マーカーの開発を目指し血清 miRNA の探索研究を行っている。これまでに、NAFLD の重症度に比例して上昇する血清 miR-122 を同定している。さらに、この miR-122 は AST,ALT などの肝障害マーカーよりもはるかに的確に、そして鋭敏に病態を反映する知見も報告している。血清 miRNA を用いて NAFLD のスクリーニングマーカーを開発することを目指している。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの探索研究で得られた知見をもとに、NAFLD のスクリーニングマーカーを確立し、臨床応用を目指すものである。これまでの知見から miR122 と miR27a が最も良く NAFLD の病態を反映する。そこで、本研究は有望な miRNA による NAFLD の新規スクリーニング検査法を確立し、実際の健康診断受診者を対象にその有用性を評価する。

3. 研究の方法

スクリーニング法を確立するために、患者ではなく一般人を利用する必要がある。申請者らは一般住民を対象とした健康診断に参画しており、検診時の血清を得ることができる。この住民検診は毎年 8 月に行われ、40 歳以上の男女が参加する。この健診受診者の検診データ及び血清を活用して評価・検討を進める。この健診受診者を対象に血清 miRNAs と NAFLD との関連を解析する。生化学的データ、画像検査、臨床情報などを利用して、詳細な病態との関連なども明らかにする。また、ROC 曲線などでスクリーニング検査としての有用性を評価する。健診サンプルを得るため、自治体の担当者には理解・協力を頂いており、研究内容について実施の許可を得ている。また倫理面に関しては、申請者が所属する大学の倫理審査委員会で研究計画の審査を受けている。

4. 研究成果

対象者は一般住民健診の受診者 469 名(男性 186 名、女性 283 名)とし、脂肪肝の有無は腹部超音波検査、アルコール消費量は質問紙法により調査した。脂肪肝を有し、アルコール消費量が男性 30 g/day、女性 20 g/day の受診者を NAFLD 群とし、脂肪肝を認めなかった受診者を Normal 群とした。これらの対象者を特性は左表に示す。

	Normal	NAFLD	p-value
n (Men/Women)	418 (155/263)	58 (31/51)	
Age (years) ^a	64.0 ±10.1	61.7 ±9.3	0.12 ^b
BMI (kg/m ²) ^a	22.9 ±3.1	26.7 ±3.0	< 0.01 ^b
HbA1c (%) ^a	5.41 ±0.48	5.84 ±1.07	< 0.01 ^b
Glucose (mg/dl) ^a	91.0 ±15.1	98.2 ±25.7	< 0.01 ^b
Total protein (g/dl) ^a	7.44 ±0.43	7.66 ±0.41	< 0.01 ^b
Albumin (g/dl) ^a	4.43 ±0.27	4.56 ±0.27	< 0.01 ^b
ALP (IU/l) ^c	210.5 (181.0-258.25)	211.0 (186.0-253.0)	0.47 ^d
AST (IU/l) ^c	22.0 (19.0-26.0)	26.0 (22.0-32.0)	< 0.01 ^d
ALT (IU/l) ^c	19.2 (15.0-25.0)	34.0 (23.0-44.0)	< 0.01 ^d
γ-GTP (IU/l) ^c	22.0 (15.0-35.5)	41.0 (27.0-69.0)	< 0.01 ^d
Triglyceride (mg/dl) ^c	83.0 (62.0-114.0)	126.0 (103.0-199.0)	< 0.01 ^d
Total cholesterol (mg/dl) ^a	210.8 ±31.1	220.2 ±36.4	< 0.05 ^b
HDL-c (mg/dl) ^c	60.0 (52.0-70.0)	51.0 (45.0-56.0)	< 0.01 ^d
LDL-c (mg/dl) ^a	122.0 ±28.7	136.0 ±33.1	< 0.01 ^b

a Data are expressed as mean value ± standard deviation,.

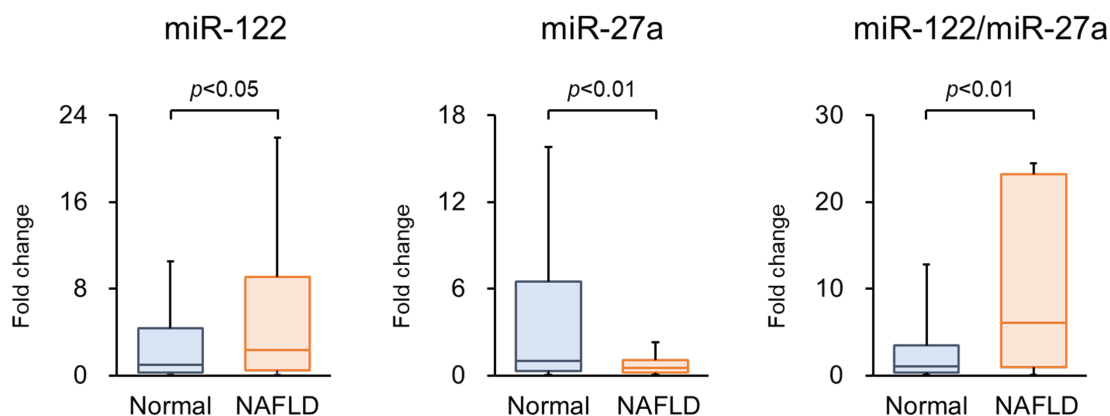
b t-Tests.

c Data are expressed as geometric mean values and 25th-75th percentiles.

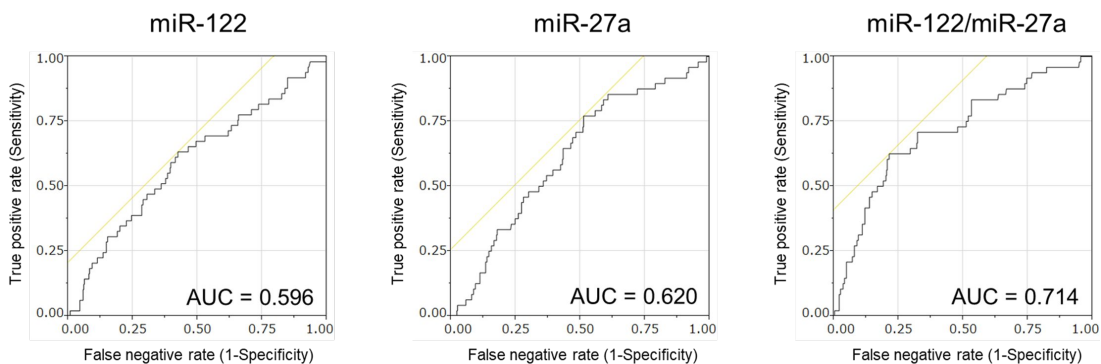
d Wilcoxon tests.

血清 miRNA 値はリアルタイム定量 PCR にてコピー数を算出し、Normal 群と NAFLD 群で比較した。

Normal 群と比較し NAFLD 群では、血清 miR-122 値が有意に上昇し ($p < 0.05$)、血清 miR-27a 値は有意に減少した ($p < 0.01$)。この2つの血清 miRNA 値の比 (miR-122/miR-27a) は NAFLD 群において有意な上昇を示した ($p < 0.01$)。



血清 miR-122 値や miR-27a 値に比べて、miR-122/miR-27a 比は ROC 曲線における AUC (曲線下面積) についても高くなった。



以上の結果から、血清 miR-122/miR-27a 比は NAFLD における新規バイオマーカーとなりうることを示唆された。今後は病態識別能の精度を上げるため詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ishikawa H, Yamada H, Kondo K, Ota T, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, Munetsuna E, Suzuki K, Teradaira R, Ohashi K.

Establishment of a simpler method for measuring HDL-microRNAs.

Ann Clin Biochem. 2019 Jan;56(1):49-55. doi: 10.1177/0004563218775770. Epub 2018 Apr 27.

Hiroaki Ishikawa, Hiroya Yamada, Nao Taromaru, Kanako Kondo, Ayuri Nagura, Mirai Yamazaki, Yoshitaka Ando, Eiji Munetsuna, Koji Suzuki, Koji Ohashi, Ryoji Teradaira

Stability of serum high-density lipoprotein-microRNAs for preanalytical conditions.

Ann Clin Biochem. 2016 May 10. pii: 0004563216647086. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 5 件)

・服部裕次、山田宏哉、宗綱栄二、山崎未来、貞本奈緒、安藤嘉崇、石川浩章、鈴木康司、寺平良治、大橋鉦二

microRNA による肝 Insulin like growth factor-1 発現制御機構の解析

第 58 回日本臨床化学会年次学術集会 2018.08 (愛知)

・太田駿瑠、近藤奏子、下平大輝、畑澤莉緒奈、山本温子、石川浩章、山崎未来、山田宏哉、宗綱栄二、鈴木康司、寺平良治、大橋鉦二

HDL 中の miRNA の細胞への移行および血中 HDL-miRNA の定量法の確立

第 64 回日本臨床検査医学会学術集会 (京都) 2017.11.16-19

・山崎未来、山田宏哉、宗綱栄二、安藤嘉崇、水野元貴、太田駿瑠、服部裕次、石川浩章、杉本恵子、刑部恵介、市野直浩、鈴木康司、寺平良治、大橋鉦二

非アルコール性脂肪性肝疾患における新規バイオマーカーとしての血清 miRNA-122/miR-27a の検討

第 57 回日本臨床化学会年次学術集会 (札幌) 2017.10.06-08

・近藤奏子、石川浩章、山崎未来、村瀬悠理、水野元貴、太田駿瑠、山田宏哉、宗綱栄二、鈴木康司、寺平良治、大橋鉦二

血中 HDL-miRNA 測定法の確立

第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 (神戸) 2016.09.1-4

・The establishment of simpler method for measuring HDL-miRNAs

Kanako Kondo, Hiroaki Ishikawa, Hiroya Yamada, Mirai Yamazaki, Yuri Murase, Genki Mizuno, Takeru Ota, Eiji Munetsuna, Koji Suzuki, Ryoji Teradaira, Koji Ohashi

14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress (APFCB 2016), 26-29 Nov, 2016, Taipei, TAIWAN

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大橋鉦二

ローマ字氏名：Ohashi Koji
所属研究機関名：藤田医科大学
部局名：医療科学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：60278281

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。