

令和元年6月13日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15776

研究課題名(和文)血清中マイクロRNAを用いた炎症性腸疾患に対する疾患鑑別および病勢判定の確立

研究課題名(英文) Identification of Serum microRNA as a Biomarker in Inflammatory Bowel Diseases

研究代表者

谷内田 達夫 (Yachida, Tatsuo)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50568847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎、クローン病、健康人の各10人の血清サンプルを用いて2555種類のmicroRNAの発現プロファイリングのパイロットスタディーを行い、炎症性腸疾患と健康者の2群間でmicroRNAのプロファイリングは階層的クラスタリングにより明確に異なることを同定した。潰瘍性大腸炎群とクローン病群を比較したクラスター解析では、潰瘍性大腸炎群において有意に上昇していたのはmiR-204-3p, miR-6803-5p, 有意に減少していたのはmiR-1199-5p, miR-4745-5p, miR-4725-3p, miR-3621であった。特にmiR-204-3pにおいて顕著な差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年Liquid biopsyとしてのmicroRNAの研究は重要視されている。炎症性腸疾患の鑑別、病勢の判定に関与する血清中バイオマーカーとしてのmicroRNAが同定できれば、治療方針(薬剤の選択)の決定に大いに寄与すると考えられる。

さらに、そのmicroRNAの研究は、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性がある。今回、潰瘍性大腸炎とクローン病の2群間では複数のmicroRNAに差を認め、特にmiR-204-3pにおいて顕著な差を認めたが、このことは、同microRNAが新しいバイオマーカーとなり得、また創薬開発に寄与する可能性を秘めていると思われる。

研究成果の概要(英文)：Cluster analysis comparing the UC group with the CD group showed that the miR-204-3p and miR-6803-5p miRNA of the UC group were significantly increased, and that of miR-1199-5p, miR-4745-5p, miR-4725-3p, and miR-3621 in the UC group was significantly decreased. In particular, there was a marked difference in miR-204-3p. We found that the miRNA of six out of 2,555 molecules in the UC and CD groups differed markedly, particularly in miR-204-3p. These data suggest that serum miR-204-3p has potential as a useful biomarker for the differentiation between UC and CD. The miR-204-3p has been suggested to be associated with inflammatory cytokine IL-6 in previous reports. Therefore, the difference of miR-204-3p among UC and CD may reflect a difference in each inflammatory disease.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：潰瘍性大腸炎 クローン病 microRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は、原因不明の難治性疾患で、代表的な疾患として潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) がある。両疾患とも厚生労働省の特定疾患指定で、これらの疾患の診断や治療に難渋することもしばしば経験する。また、生活習慣の欧米化に伴い、日本でも患者数の増加が著しく UC は約 18 万人、CD は約 4 万人と報告されている。

両疾患の診断、治療に当たっては、厚労省研究班で作成された治療指針やガイドラインが使われるが、UC と CD の鑑別が一般的な検査所見では鑑別困難なことがあり、その他の腸炎を来す疾患と鑑別困難なことがある。また、病勢に関しても様々なバイオマーカーが報告されているが、臨床応用されているものは少ない。ヒトゲノム解析の成果により、多くの蛋白コード遺伝子の機能が解明されているが、同時に、蛋白をコードしない部分から転写される多数のマイクロ RNA (miRNA) の存在が浮き彫りとなり、遺伝子発現調節への関与が注目されるようになった。miRNA は内在性の 21~25 塩基程度の小さな一本鎖 RNA であり、標的 mRNA の 3' 側非翻訳領域の一部と配列依存的に結合することにより、分解または翻訳の阻害を引き起こし発現の調節をおこなっている。

miRNA は複数の標的遺伝子の発現を調節しており、炎症に関連するサイトカインや免疫系細胞の発生にも関与している可能性がある。また診断・予後マーカーとしても有用視されている。近年、我々のグループは、種々の癌 (食道、胃、肝) において発現している miRNA が、正常組織と比較し、著明に変化していることを実験系で明らかにするとともに、特定の miRNA が細胞の腫瘍化・進展に関与していることを報告してきた。

最近になって、IBD における miRNA の関与が注目されるようになり、いくつかの疾患において、特定の miRNA の発現異常が指摘されている。UC の腸管組織における miRNA 発現の解析では miR-192, miR-12, miR-16 が指摘されており、UC の病態に関係していると推測されている。その他に miR-375, miR-422b の発現低下および miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195 の発現増加が報告されているが、UC との病態における役割については明らかではない。IBD 患者における miRNA の発現プロファイルの異常については、いまだ不明な点が多く、今回検討課題として、病型 (小腸型クローン病、大腸型クローン病、潰瘍性大腸炎) における比較、同一症例における活動期と寛解期の変化や治療前後における影響を検討する。

IBD 患者の血清を用いた miRNA 解析は報告例は極めて少なく、miRNA は複数の標的遺伝子の発現を調節していることから、単一で有用なマーカーになり得る可能性がある。病状進行や潰瘍性大腸炎およびクローン病の鑑別可能な新たなバイオマーカー発見し、それはまた有効な治療の標的となり得る可能性があり適切な個別化治療を行うため診断や治療への応用が期待される。

### 2. 研究の目的

IBD における特異的 miRNA の同定し、診断マーカー・治療の有効性の確認、予後判定としての有用性や治療分子としての可能性を明らかにすることを目的とする。今回、IBD の患者末梢血液の全血遺伝子発現について miRNA の網羅的解析し、発現に変化を示した miRNA に関する生物学的特徴を検討する。また非 IBD 患者 (健康人) と比較し、特異性をより明確に判定する。

### 2. 研究の方法

#### (1-a) サンプルの準備

miRNA の網羅的解析のために用いる末梢血液は、外来または入院患者の血液検査時に収集する。収集された末梢血液は実験で使用するまで、高品質な RNA を抽出するため、RNA の安定化溶液 (Ambion 社、RNA later) に浸し、その後超低温フリーザーで保存する。クローン病、潰瘍性大腸炎、健康人の末梢血液を各々 20 例の収集を目標とする。

#### (1-b) アレイを用いた miRNA の網羅的解析

血清由来の miRNA を回収し、これをアレイ用のサンプルとする。アレイ (東レ、2555 分子の miRNA を搭載、本応募研究課題で申請) に、標識 (Ambion 社、mirVana™ miRNA labeling kit、本応募研究課題で申請) したサンプルをオリゴチップ (東レ、Human miRNA Oligo chip-4 plex ver.21) にハイブリダイゼーションした後、アレイ用スキャナー (当講座で既に保有) でスキャンを行う。その後各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行い、シグナル値を算出し、血清内の miRNA を同定する。

#### (1-c) miRNA 発現プロファイルの解析

発現プロファイルの解析は、計算解析サーバを使用し、従来の統計学的方法のみならずマイクロアレイに適した統計的手法 SAM (Significant Analysis of Microarray)、RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray) などを用いる。そして、IBD 群と健康群、UC 群と CD 群において、2555 分子の血清中の miRNA の解析により、それぞれ独立したクラスターを形成するかどうかを確認する。

#### (2) IBD において特異的に発現増強・減弱する miRNA の標的遺伝子予測

IBD の網羅的解析で得られた miRNA が、どのメッセンジャー RNA 分子を制御するかを予測検討する。miRNA のターゲット遺伝子予測は、従来のターゲット遺伝子予測プログラムのデータベースである miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>), University of California at Santa

Cruz (UCSC) Human Genome Browser(<http://genome.cse.ucsc.edu>) および Human micro RNA Targets (<http://www.microrna.org>)を利用するにとどまらず、最新のゲノム情報に基づき新たなターゲット遺伝子の予測を試み、IBDに特異的に発現するmiRNAの標的遺伝子を予測する。

(3) IBDにおいて特異的に発現増強・減弱するmiRNAの標的遺伝子の実験的確認

たとえば、IBDで減弱するmiRNA(マイクロA分子とする)のターゲット分子がB遺伝子であることを次の方法で実験的に確認する。マイクロAの結合部位を含むB遺伝子のcDNAが入った発現ベクター(ORIGENE社)を、一過性発現に適した細胞株であるCOS7にリポソーム法で遺伝子導入(Novagen社、GeneJuice Transfection Reagent)し、導入後、12時間後にマイクロAを導入し(マイクロA導入群、Ambion社、siOORTTMNEOFEXTM Transfection Agent)、その12時間後のBの発現をWestern blotで調べる。さらに、COS7にB発現ベクターを導入12時間後、コントロールmiRNAを導入し(コントロールmiRNA導入群、Ambion社、Pre-miRTM-miRNA precursor Molecule)、その12時間後のBの発現をWestern blotで解析する。仮に、マイクロAのターゲット分子がB遺伝子をターゲットとするならば、COS7のBの発現は、コントロールmiRNA導入群と比較し、マイクロA導入群は、B遺伝子のタンパクレベルは減弱すると考えられる。

(4) IBDにおいて特異的に発現増強、減弱するmiRNAの腫瘍細胞内での機能解析

対象疾患において特異的に発現増強、減弱するmiRNAの機能解析をする上で、リポソーム法によりmiRNA活性を上げる合成miRNA(Ambion社、mirVanaTM miRNA mimic)あるいは、miRNA活性を下げる合成miRNA阻害分子(Ambion社、mirVanaTM miRNA inhibitor)をIBD細胞株に導入する。そして導入後、どの蛋白質に影響を与えたかを炎症に関連する分子の蛋白アレイチップ(Lab Vision Corporation社)を用いて網羅的に解析する。これらの解析を通じ対象疾患において特異的に発現増強、減弱するmiRNAの直接、間接的に影響を与えるシグナル分子群を同定する。

#### 4. 研究成果

潰瘍性大腸炎、クローン病、健常人の各10人の血清サンプルを用いて2555種類のmicroRNAの発現プロファイリングのパイロットスタディーを行い、炎症性腸疾患と健常者の2群間でmicroRNAのプロファイリングは階層的クラスタリングにより明確に異なることを同定した。潰瘍性大腸炎群とクローン病群を比較したクラスター解析では、潰瘍性大腸炎群において有意に上昇していたmiRNAはmiR-204-3p, miR-6803-5p, 有意に減少していたmiRNAはmiR-1199-5p, miR-4745-5p, miR-4725-3p, miR-3621であった。特にmiR-204-3pにおいてFold Change ration(FCR)4.33(p=0.00001)顕著な差を認めた。miR-6803-5pはFCR=1.26(p=0.002)潰瘍性大腸炎群において有意に上昇していた。miR-1199-5pでFCR 0.59(p=0.008), miR-4745-5pでFCR 0.37(p=0.0001), miR-4725-3pでFCR 0.64(p=0.002), miR-3621でFCR 0.86(p=0.001)の差がみられ潰瘍性大腸炎群で有意に減少していた。

特にmiR-204-3pにおいて顕著な差があり、このことはこれまで報告されていない新規の発見であった。今後、さらに解析をすすめる予定にしている。

(英文)

Cluster analysis comparing the UC group with the CD group showed that the miR-204-3p and miR-6803-5p miRNA of the UC group were significantly increased, and that of miR-1199-5p, miR-4745-5p, miR-4725-3p, and miR-3621 in the UC group was significantly decreased. In particular, there was a marked difference in miR-204-3p. We found that the miRNA of six out of 2,555 molecules in the UC and CD groups differed markedly, particularly in miR-204-3p. These data suggest that serum miR-204-3p has potential as a useful biomarker for the differentiation between UC and CD. The miR-204-3p has been suggested to be associated with inflammatory cytokine IL-6 in previous reports. Therefore, the difference of miR-204-3p among UC and CD may reflect a difference in each inflammatory disease.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1)潰瘍性大腸炎、クローン病患者における血清microRNAのバイオマーカーとしての同定 The diagnosis as a biomarker of the serum microRNA in IBD

谷内田達夫、小林伸也、千代大翔、西山典子、小原英幹、森 宏仁、舛形 尚、岩間久和、正木 勉

第14回日本消化管学会総会学術集会 2018.2.9-10

2)炎症性腸疾患の診断、鑑別における血清microRNAのバイオマーカーとしての同定

谷内田達夫、藤森絢子、小林伸也、千代大翔、西山典子、小原英幹、森 宏仁、岩間久和、舛形 尚、正木 勉

3)炎症性腸疾患における血清 microRNA のバイオマーカーとしての同定

谷内田達夫、小林伸也、千代大翔、西山典子、小原英幹、森 宏仁、舩形 尚、岩間久和、正木 勉

第 59 回日本消化器病学会大会 2017.10.12-15

〔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

香川大学医学部

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(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。