様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　５月２３日現在

機関番号：１６２０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０７４１６

研究課題名（和文）原発性胆汁性胆管炎におけるエクソソーム内のmicroRNAを標的とした予後予測

研究課題名（英文）Prediction of prognosis targeting microRNAs in exosomes in primary biliary cholangitis

研究代表者
野村　貴子（Nomura, Takako）

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：７０６４５４１５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：原発性胆汁性胆管炎(Primary biliary cholangitis; PBC)患者の末梢血液におけるエクソソーム(細胞外分泌小胞)内のmicroRNA (miRNA)について網羅的解析を行い、今後、適切な個別化治療を行うためのバイオマーカー、また、治療効果予測因子と成り得る可能性について検討した。
ウルソデオキシコール酸(Ursodeoxycholic acid; UDCA)による治療効果良好群と治療効果不良群に分類して検討したところ、4分子(hsa-miR-940, hsa-miR-1470, hsa-miR-3663-3p, hsa-miR-4632-3p)が候補として挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
PBCの第1選択薬はウルソデオキシコール酸(Ursodeoxycholic acid; UDCA)であり、UDCAに対する治療反応性が良好であれば生命予後は一般集団とほぼ同等であるが、治療反応性が不良な場合には徐々に進行して肝硬変へ至り、肝不全ないし肝細胞癌を発症する。治療開始後の早期に何らかの基準を用いてUDCAに対する治療反応性を判定し、治療反応性が不良と判断された場合には速やかにセカンドラインの治療を行うことが重要と考える。今回の研究成果が、治療開始早期の治療効果判定の一助になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A comprehensive analysis of microRNAs (miRNAs) in exosomes (exocellular vesicles) in the peripheral blood of patients with primary biliary cholangitis (PBC), and the biological characteristics of miRNAs that showed altered expression. We investigated the possibility that miRNAs in exosomes could serve as biomarkers and predictors of therapeutic effects for appropriate personalized treatment in the future.
In a study classified into a group with good therapeutic effect and a group with poor therapeutic effect with ursodeoxycholic acid (UDCA), 4 molecules (hsa-miR-940, hsa-miR-1470, hsa-miR-3663-3p, hsa-miR-4632-3p) were listed as a candidate.

研究分野：自己免疫性肝疾患

キーワード：原発性胆汁性胆管炎　microRNA

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

慢性肝疾患においてウイルス性肝炎が撲滅に向かう一方で、PBCなどの自己免疫性肝疾患は今後も更に増加することが見込まれている。PBCは肝内小型胆管が自己免疫学的機序によって破壊され、慢性進行性に胆汁うっ滞を呈する肝疾患とされている。ただし原因は未だ不明で根本的な治療ができないことから、厚生労働省による難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されており、年次別有病者数は年々増加している。現在第１選択薬はウルソデオキシコール酸（Ursodeoxycholic acid; UDCA）であり、UDCAに対する治療反応性が良好であれば生命予後は一般集団とほぼ同等であるが、治療反応性が不良な場合には徐々に進行して肝硬変へ至り、肝不全ないし肝細胞癌を発症する。治療開始前もしくは治療開始後の早期に何らかの基準を用いてUDCAに対する治療反応性を判定し、治療反応性が不良と判断された場合には速やかにセカンドラインの治療を行うことが重要と考える。現状では治療反応性について治療開始前や治療開始後の早期に判断することができないため、他の薬剤の具体的な併用時期や患者個別の至適投与量、治療効果判定時期等について、未だコンセンサスが得られておらず、今後の課題となっている。

我々のグループでは、これまでにPBCのみならず、肝細胞癌及び肝内胆管癌や非アルコール性脂肪性肝炎などの多岐に渡る消化器疾患におけるmiRNAの網羅的解析を行い 、各々の病態や治療法との関連について検討を重ねてきた。中でもPBCに関しては、１年以上の薬物治療を受けたPBC患者9症例を対象として、患者血清からtotal RNAを抽出し、2555分子が搭載されたmiRNAアレイチップを用いて網羅的に解析を行ったところ、クラスタリングでは治療抵抗群と治療有効群で異なる発現パターンがみられ、hsa-miR-1181、6879-3p、7113-3pの3分子のmiRNAが、治療有効群において有意に増強し、治療抵抗群において有意に減弱していることを指摘できた(図1)。中でもhsa-miR-1181については、シード配列が、ヒト以外の霊長類でも種を超えて保存されており、重要な因子であることが示された(図2)。治療有効群ではhsa-miR-1181が増強しており、STAT3やHOXA10といった標的遺伝子を抑制に導くことによって、炎症やアポトーシス、細胞増殖が抑制されるといった機序が示唆された。これらのことから、血清中のmiRNAがPBCの病態に密接に関与し、PBCの治療反応性を予測し得るバイオマーカーとなる可能性について示唆する結果が得られたと言える。これらが本研究の学術的背景である。

しかしながら、これまでの研究で得られたPBCの治療抵抗群と有効群を区別するmiRNAは、血清全体のmiRNAから見出されたものである。血清中のmiRNAには、1) エクソソームに含まれるmiRNA、2) 脂質・蛋白質に結合したmiRNA、3) アポトーシス小体に含まれるmiRNA、4) 細胞から漏出したmiRNAがある。本来壊れやすいmiRNAがエクソソームに内包されることによって、分解酵素が豊富な血中でも安定化されることが近年指摘された。故に、予後予測への実臨床へ繋げるためには、やはりPBCの治療抵抗群と有効群を区別するmiRNAをエクソソーム内のmiRNAから検索すべきと考える。

以上の点から、エクソソーム内のmiRNAはPBCの予後予測における適切なバイオマーカーとなり得るのか、というのが本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

図1.

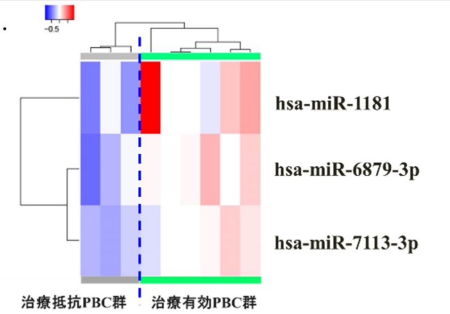
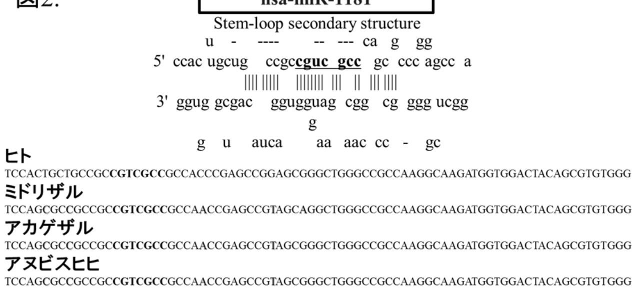


図2.



２．研究の目的

本研究の目的は、PBC 患者の末梢血液に存在するエクソソーム内の miRNA を同定し、それらの網羅的解析を行うことにより、これまでは到達できなかった PBC の治療効果判定予測への応用を検討することである。また、治療開始前や治療開始後の早期に判断するバイオマーカーとしての可能性を検索して、病状の進行を抑制する治療法へと繋げることを目標とする。

PBC 発症の原因は未だ不明であり、この点はウイルス性肝炎などの他の慢性肝疾患と大きく異なり、疾患克服という点から見ると大きな停滞状況であることは否めない。また、病態形成について自己免疫学的機序に着目した多くの研究がなされてきたが、自己免疫反応を起こす契機となるトリガーは同定されていない。その中で、我々のグループではこれまでに多岐に渡る消化器疾患における miRNA の網羅的解析を行っており、それらの実績に基づいて PBC における胆管上皮細胞での分子表出の異常の原因として miRNA に着目したことは学術的独自性がある。

疾患特異的な細胞が分泌する特定の物質を持ったエクソソームは、一定期間全身の体液中を循環している可能性が高く、特に血中で安定的である。そのため、エクソソームに内包された miRNA を標的とすることで非侵襲的に繰り返し解析を行うことができ、かつ客観的に評価できる点は有用性が高い。PBC の予後予測はこれまで未到達の領域であり、更にはエクソソーム内の miRNA を標的とした研究は報告されておらず、学術的創造性に富むと考える。

３．研究の方法

1) PBC 患者の末梢血液に含まれるエクソソームの回収及びエクソソーム内の miRNA 抽出

PBC 患者の末梢血液はおおよそ 30 例を目標として、外来または入院患者の血液検査を施行する際に同時に収集する。収集された末梢血液から血清を分離して溶血のないことを確認し、遠心による前処理を行った後、エクソソーム溶液を miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を使用して、small RNA を含む total RNA として抽出する。これらの RNA の品質は、Agilent 2100 バイオアナライザー (当講座で既に保有)により検討する。この RNA が、小分子の RNA 領域に高いピークが認められ、高分子領域のリボソーム RNA にピークバンドが検出できなければ、エクソソーム由来の RNA として確認できる。ヒト末梢血液由来サンプルからの miRNA を使用することは、サンプルが採取し易く、凍結融解及び温度や酸などに対して安定なためバイオマーカーとして良質である点が、効果的に研究を進める上でのアイデアである。

2) エクソソーム内の miRNA についての網羅的解析とクラスター解析

2.-a) アレイを用いた miRNA の網羅的解析

エクソソーム由来の 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)に、標識 (Ambion 社、mirVana™ miRNA labeling kit)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)でスキャニングを行う。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、エクソソーム内の miRNA を同定する。

2.-b) エクソソーム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、PBC の治療抵抗群と治療良好群において、2555 分子のエクソソーム内の 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。

3) PBC の治療反応性に関与するエクソソーム内の miRNA の同定と定量

PBC の治療抵抗群と治療良好群において、差異のみられた miRNA を同定し、どのようにどの程度発現しているか、リアルタイム PCR 法により定量を行い、個別に検証する。予定している miRNA の解析手法では、高感度チップを利用するため、再現性が高く、定量的に解析できるのが特徴である。

4) PBC の治療反応性に関与するエクソソーム内の miRNA の標的遺伝子の予測

miRNA はその特性が複雑なため、ターゲット配列の認識様式は未だ研究途上にある。標的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)及び Human micro RNA Targets (http://www.microrna.org)などを利用して予測を試みる。また、患者の臨床学的特徴や病態との相互関係について検討し、バイオマーカーとしての絞り込みを行う。バイオインフォマティクスの手法を用いた解析については、連携研究者であるその分野の専門家からの支援が得られるため、効率的に遂行できると考えられる。

5) PBC の治療反応性に関連するパスウェイの解析

治療反応性への関与が予測された標的遺伝子を抑制もしくは増強に導くことにより、炎症やアポトーシス、細胞増殖へと関連することが示唆されるため、それぞれの遺伝子領域におけるパスウェイを解析し、治療反応性と病態との関係性を考察する。

４．研究成果

本研究代表者の研究の実施及び総括の下に、当講座の研究分担者 5 名がそれぞれの研究計画を遂行する。主として、正木が研究指導、米山・坂本が末梢血液に含まれるエクソソームの回収及びエクソソーム内の miRNA 抽出、森下・藤田がエクソソーム内の miRNA の同定と定量及びパスウェイの解析を分担して行った。クラスター解析やデータベースを利用した miRNA の標的遺伝子予測については、連携研究者である当大学総合生命科学研究センターの岩間と共に行った。

原発性胆汁性胆管炎患者20例の末梢血液を収集し、エクソソーム溶液をmiRNeasy Mini Kit を使用して、収集された末梢血液からsmall RNAを含むtotal RNAとして抽出した。エクソソーム由来のmiRNAをアレイ用のサンプルとし、アレイ(東レ、2555分子のmiRNAを搭載)に、標識したサンプルをオリゴチップにハイブリダイゼーションした後、アレイ用スキャナーでスキャニングを行った。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、エクソソーム内のmiRNAを同定した。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に加え、統計的手法SAM (Significant Analysis of Microarray)、RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray)を用いた。そして、PBCの治療抵抗群と治療良好群において、2555分子のエクソソーム内の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検討した。治療開始直後と1ヶ月後を比較すると、25分子で差異がみられた。ALP及びγ-GTP値によって治療良好群と治療抵抗群に分類した結果では、治療開始1ヶ月後においてクラスターの形成はみられなかった。治療開始1ヶ月後において、サンプル中の年齢中央値未満と年齢中央値以上に分類するとクラスターの形成がみられ、4分子（hsa-miR-940・hsa-miR-1470・hsa-miR-3663-3p・hsa-miR-4632-3p）で差異を確認した。差異のみられたmiRNAについてリアルタイムPCR法により定量的な解析を行った。また、標的遺伝子予測プログラムのデータベースを利用し、標的遺伝子の増強もしくは抑制の機序と炎症やアポトーシス、細胞増殖との関連について検討したところ、hsa-miR-940は、癌細胞と比較して不死化した正常細胞で高度に発現することが確認および検証されており、MIEN1の調節因子である。

PBCの第1選択薬はウルソデオキシコール酸(Ursodeoxycholic acid; UDCA)であり、UDCAに対する治療反応性が良好であれば生命予後は一般集団とほぼ同等であるが、治療反応性が不良な場合には徐々に進行して肝硬変へ至り、肝不全ないし肝細胞癌を発症する。治療開始後の早期に何らかの基準を用いてUDCAに対する治療反応性を判定し、治療反応性が不良と判断された場合には速やかにセカンドラインの治療を行うことが重要と考える。今回の研究成果が、治療開始早期の治療効果判定の一助になる可能性がある。

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〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	正木　勉 (Masaki Tsutomu) (30335848)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	坂本　鉄平 (Sakamoto Teppei) (30769328)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	
研究分担者	藤田　浩二 (Fujita Kouji) (50749421)	香川大学・医学部附属病院・病院助教 (16201)	
研究分担者	森下　朝洋 (Morishita Asahiro) (60423430)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	
研究分担者	米山　弘人 (Yoneyama Hirohito) (80294750)	香川大学・医学部・助教 (16201)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関