

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15798

研究課題名(和文) 自己免疫性消化器疾患の横断的血清miRNA解析による新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method using serum miRNA analyses in autoimmune gastrointestinal and liver diseases

研究代表者

高野 啓子 (Takano, Keiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00817207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AIHとPBCに着目しmiRNAマイクロアレイにて網羅的発現解析を行い、診断および疾患進展・治療反応性等の病勢評価マーカー指標となりうるmiRNAsを検討した。特にAIHで高値を示すmiRNAs(miR-3196, miR-6125, miR-4725-3 p and miR-4634)を同定し、AIHとPBCを高い感度特異度で診断できた。In situ hybridization法でこれらmiRNAの局在はAIH患者の肝細胞細胞質に中等度から高度に発現を認め、ステロイド治療によりこれらのmiRNAレベルの低下を認め組織学的に肝炎活動性と相関することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性肝疾患は総じて難治性かつ進行性の希少疾患である。miRNAはタンパクをコードしない小分子RNAで、mRNAへの翻訳抑制作用により様々な生命現象を制御している。近年、miRNAは機能的分泌や細胞破壊による遊離により血液中に放出され、その発現プロファイルは疾患やその病態毎に異なることが報告されており、早期診断や疾患進展・治療反応性マーカーとしての臨床応用が期待されている。本研究における我々の研究成果により同定されたAIH高値となるmiRNAsは、AIHの診断および病勢評価バイオマーカーとなる可能性を示しており、有益な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed a comprehensive expression analysis using miRNA microarrays focusing on the autoimmune liver diseases AIH and PBC. 28 AIH cases and 29 PBC cases were analyzed for miRNAs that could serve as screening indicators for diagnosis and disease assessment, such as disease activity and response to treatment. We found several miRNAs that varied significantly in each disease. In particular, four miRNAs (miR-3196, miR-6125, miR-4725-3 p and miR-4634) were identified that were highly elevated in AIH and could clearly diagnose AIH and PBC with high sensitivity and specificity. In situ hybridization showed that the localization of these miRNAs was moderately to highly expressed in the hepatocyte cytoplasm of AIH patients. Furthermore, steroid treatment reduced the levels of these miRNAs, which correlated histologically with sever hepatic necroinflammatory activity. Therefore, the identified miRNAs were suggested to be potential diagnostic and disease assessment biomarkers for AIH.

研究分野：消化器

キーワード：AIH PBC miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究課題名 (和文); 自己免疫性消化器疾患の横断的血清 miRNA 解析による新規診断法の開発

研究課題名 (英語) Development of diagnostic method using serum miRNA analyses in autoimmune gastrointestinal and liver diseases

#### 研究成果の概要 (和文)

自己免疫性肝疾患である AIH と PBC に着目し miRNA マイクロアレイを用いて網羅的発現解析を行った。AIH 28 例、PBC 29 例の解析において、診断および疾患進展・治療反応性等の病勢評価スクリーニング指標となりえる miRNAs を検討した。特に AIH で高値を示す miRNAs (miR-3196, miR-6125, miR-4725-3 p and miR-4634) 4 つを同定し、これらは AIH と PBC を高い感度特異度で明確に診断することが可能であった。In situ hybridization 法でこれらの miRNA の局在は、AIH 患者の肝細胞細胞質に中等度から高度に発現を認め、さらにステロイド治療によりこれらの miRNA レベルの低下を認め、組織学的に肝炎活動性と相関することを見出した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性肝疾患は総じて難治性かつ進行性の希少疾患である。miRNA はタンパクをコードしない小分子 RNA で、mRNA への翻訳抑制作用により様々な生命現象を制御している。近年、miRNA は機能的分泌や細胞破壊による遊離により血液中に放出され、その発現プロファイルは疾患やその病態毎に異なることが報告されており、早期診断や疾患進展・治療反応性マーカーとしての臨床応用が期待されている。本研究における我々の研究成果により同定された AIH 高値となる miRNAs は、AIH の診断および病勢評価バイオマーカーとなる可能性を示しており、有益な発見であると考えられる。

#### 研究成果の概要 (英文)

We performed a comprehensive expression analysis using miRNA microarrays focusing on the autoimmune liver diseases AIH and PBC. 28 AIH cases and 29 PBC cases were analyzed for miRNAs that could serve as screening indicators for diagnosis and disease assessment, such as disease activity and response to treatment. We found several miRNAs that varied significantly in each disease. In particular, four miRNAs (miR-3196, miR-6125, miR-4725-3 p and miR-4634) were identified that were highly elevated in AIH and could clearly diagnose AIH and PBC with high sensitivity and specificity. In situ hybridization showed that the localization of these miRNAs was moderately to highly expressed in the hepatocyte cytoplasm of AIH patients. Furthermore, steroid treatment reduced the levels of these miRNAs, which correlated histologically with severe hepatic necroinflammatory activity. Therefore, the identified miRNAs were suggested to be potential diagnostic and disease assessment biomarkers for AIH.

#### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性消化器疾患は総じて難治性かつ進行性の希少疾患である。本来、消化管と肝臓は外来異物を体内に取り込む臓器のため免疫の寛容性が高い臓器である。しかし原因不明の免疫寛容系メカニズムの破綻と自己抗原・抗体の出現により難解な病態が形成される。各自己免疫性消化器疾患には診断基準があるが、自己抗体が検出されない等の非典型例、他の自己免疫性消化器疾患を合併するオーバーラップ症例、自己免疫性消化器疾患と類似した病理像を示す炎症性疾患など診断に難渋するケースもある。このような症例では治療選択が困難となり、適切な治療が行われないために疾患が進行してしまう症例も少なからず存在する。これらの問題は自己免疫性消化器疾患の難解な病態にも起因するが、診断基準の構成にも要因がある。各々の診断基準はその疾患の特徴的な臨

床所見と血液・生化学所見により構成される。よって自己免疫性消化器疾患としての一元的な評価を行うことができず、非典型例での診断が困難となる。従って自己免疫性消化器疾患の的確かつ正確な診断のために、自己免疫性消化器疾患を一つの価値尺度で評価し構築した診断法の開発が急務であると考えられた。

## 2. 研究の目的

miRNA はタンパクをコードしない小分子 RNA で、mRNA への翻訳抑制作用により様々な生命現象を制御している。近年、miRNA は機能的分泌や細胞破壊による遊離により血液中に放出され、その発現プロファイルは疾患やその病態毎に異なることが報告されており、早期診断や疾患進展・治療反応性マーカーとしての臨床応用が期待されている。申請者の研究グループでは以前よりこの miRNA に着目し自己免疫性消化器疾患の病態との関連を解析してきた。近年では、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の CD4<sup>+</sup>T 細胞で変動する miRNA、特に miR-425 がその炎症性サイトカイン産生の制御を介して病態形成に重要な役割を果たすことを報告した (Nakagawa et al, *J Hepatol*, 2017)。さらに、これまでに得られた知見から興味深いことに PBC と自己免疫性肝炎 (AIH) では CD4<sup>+</sup>T 細胞での miRNA 発現プロファイルが全く異なっていることが明らかとなった。従って、自己免疫性消化器疾患での miRNA 発現は、それぞれの疾患で異なる可能性があることが示唆された。実際、自己免疫性消化器疾患においても疾患ごとに miRNA 発現解析が行われ、報告間で疾患ごとの miRNA 発現は異なるものであった (Loosen et al, *World J Hepatol*, 2017)。しかし、これまでに自己免疫性消化器疾患において横断的に miRNA 発現解析を行った解析はない。また、AIH の約半数において、ステロイド等の治療により血清学的寛解が得られていても、肝生検による組織学的所見では活動性が持続していることが知られており、炎症を伴う病勢評価のための非侵襲的なバイオマーカーが切望されている。そこで申請者は、自己免疫性消化器疾患の血清 miRNA 解析を網羅的かつ横断的に行うことで自己免疫性消化器疾患の新たな診断および病勢評価ツールの構築を目的とし、解析を行った。

## 3. 研究の方法

自己免疫性消化器疾患と健常人の血清 miRNA 発現解析を行った。対象はまず自己免疫性消化器疾患の中で、PBC、AIH を選択し、健常人コントロールも合わせて十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に血清を採取した。各疾患の未治療例、治療奏功例、寛解例など様々な患者からの採取した検体は連結匿名化処理を行った後、国立癌研究センター分子細胞治療研究分野との共同研究で miRNA マイクロアレイを用いて網羅的発現解析を行った。また同定した miRNA の組織での発現の局在を調べるために In situ hybridization による解析を行った。

さらに上記で同定された miRNA の変動の原因を培養細胞により分子生物学的に解析するために、肝細胞由来培養細胞、免疫細胞系培養細胞に炎症誘導物質やサイトカインによる刺激を与え、その培養上清中に分泌された miRNA の発現を解析した。また、その機能解析として遺伝子導入手法を用いて培養細胞に合成 miRNA を導入しその表現形を解析した。

## 4. 研究成果

これまでに我々は自己免疫性肝疾患である AIH と PBC にまず着目し miRNA マイクロアレイを用いて網羅的発現解析を行った。AIH 28 例、PBC 29 例の解析において、早期診断および疾患進展・治療反応性等の病勢評価スクリーニング指標となり得るか否かを検討したところ、それぞれの疾患で有意に変動する複数の miRNA を見出した。特に AIH で高値を示す miRNAs ( miR-3196, miR-6125, miR-4725-3 p and miR-4634 ) 4 つを同定し、これらは AIH と PBC を高い感度特異度で明確に診断することが可能であった。また、In situ hybridization 法でこれらの miRNA の局在は、AIH 患者の肝細胞細胞質に中等度から高度に発現を認めた。さらに、ステロイド治療によりこれらの miRNA レベルの低下を認め、組織学的に肝炎活動性と相関することが明らかとなった。従って同定した miRNAs は、AIH の診断および病勢評価バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

また、同定された miRNAs の機能を解析するため肝細胞由来培養細胞、免疫細胞系培養細胞を用いた実験においては、遺伝子導入手法を用いた培養細胞に合成 miRNA を導入がうまくいかずに当初の計画よりだいぶ遅延し、その条件検討に時間を要した。今後

さらなる機能解析を継続する。さらに化合物ライブラリーから同定された miRNA および制御される signaling pathway がもし活性化されていれば、これを阻害する化合物を検索し細胞増殖およびサイトカイン産生への影響を解析することで新規治療法への応用を検討する予定である。

今回我々が見出した複数の miRNA において miRNA 発現と診断のみならず、疾患の活動性や予後、治療反応性など疾患の臨床データとの関連性について症例を集積し、より詳細に解析していく。また、同定した miRNA が制御する下流の遺伝子及びシグナル経路を Bioinformatics 解析により明らかにしていく予定である。これらの解析により自己免疫性消化器病疾患の早期診断や疾患進展・治療反応性マーカーとしての有用性を明らかにしたい。

## 5 . 主な発表論文等

Saeki C, Matsuzaki J, Kuroda M, Fujita K, Ichikawa M, Takizawa S, Takano K, Oikawa T, Nakanuma Y, Saruta M, Ochiya T, Tsubota A.

Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for hepatic necroinflammation in patients with autoimmune hepatitis.

BMJ Open Gastroenterol 2022;9(1):e000879.

doi: 10.1136/bmjgast-2022-000879.

査読 有り

オープンアクセス

学会発表 0 件

図書 0 件

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saeki C, Matsuzaki J, Kuroda M, Fujita K, Ichikawa M, Takizawa S, Takano K, Oikawa T, Nakanuma Y, Saruta M, Ochiya T, Tsubota A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for hepatic necroinflammation in patients with autoimmune hepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjgast-2022-000879.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------