

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09724

研究課題名（和文）血清エクソソーム由来マイクロRNA解析によるベーチェット病のバイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploring biomarkers for Behcet's disease by analysis of serum exosome-derived microRNAs

研究代表者

竹内 正樹（TAKEUCHI, Masaki）

横浜市立大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号：80794081

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）：ベーチェット病は発作と寛解を繰り返す原因不明の炎症性疾患である。診断は複数の症状の組み合わせで行い、特異的なバイオマーカーに乏しい。今回、我々はベーチェット病の発症や病態形成にエクソソームが関与していると仮説を立て研究を遂行した。本研究では、ベーチェット病患者および健常者の血清からエクソソーム由来のmiRNAの抽出を行った。単離したmiRNAを対象に、ゲノム全域に位置するmature-miRNAの網羅的な発現解析を実行した。得られたエクソソーム情報と臨床情報との関連についての解析、パスウェイ解析を行うことで、ベーチェット病の病態の解明およびバイオマーカーの候補となるmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ベーチェット病の発症や病態形成に関わるエクソソーム由来のmiRNAを明らかとし、病態解明や効果的な治療標的の開発につながると考えている。今後は日本人、台湾人の検体を用いて本研究結果の再現性の検討やそれぞれの人種に特異的なバイオマーカーの検索を行っていく。将来的には、ベーチェット病のバイオマーカーの同定による早期診断の実現、さらには患者個々のエクソソーム情報も踏まえた個別化医療の開発を目指していく。

研究成果の概要（英文）：Behcet's disease is an inflammatory disorder of unknown cause with recurrent attacks and remissions. Diagnosis is based on a combination of symptoms and lacks specific biomarkers. In this study, we hypothesized that exosomes are involved in the pathogenesis and development of Behcet's disease. In this study, we extracted exosome-derived miRNAs from serum of Behcet's disease patients and healthy subjects. A comprehensive genome-wide mature miRNA expression analysis was performed on the isolated miRNAs. By analyzing the association of the exosome information with clinical information and pathway analysis, we identified miRNAs that could be used to elucidate the pathogenesis of Behcet's disease and as candidate biomarkers.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：ベーチェット病 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病は全身の諸臓器に発作と寛解を繰り返す炎症性疾患であり、環境要因と遺伝的要因が複合的に作用して発症に関与すると考えられている。近年、研究代表者らはベーチェット病の大規模なゲノム解析研究を行い多数の疾患感受性遺伝子を同定し病態の理解を深めたが、依然として全容の解明には至っていない。抗 TNF 製剤をはじめとする生物学的製剤の適応承認により、ベーチェット病治療は大きく進歩したが、それでもなお、重症例では失明や消化管穿孔など Quality of Life (QOL) や生命にかかわる重篤な症状を呈する。

(2) ベーチェット病では早期診断、早期治療が重要である。しかし、各症状により症状の出現時期が異なるため、複数の症状が出揃って診断基準を満たすまでにはタイムラグが生じてしまい、適切な治療の開始のタイミングが遅れる可能性がある。ベーチェット病診療の課題の要因の一つに、ベーチェット病に特有のバイオマーカーが確立されていないことが挙げられる。予後や症状出現の予測因子となるバイオマーカーが確立されれば、早期診断や疾患予後に基づく適切な治療の選択の実現が可能となる。

(3) エクソソーム (Exosome) は、多くの細胞で分泌される直径 30 ~ 150nm 程度の細胞外小胞の一種である。エクソソームの内部には核酸 (マイクロ RNA、メッセンジャー RNA など) やタンパク質を含んでおり、細胞間の情報伝達を担っている。近年、エクソソーム由来の分子 (主にマイクロ RNA (miRNA)) が癌や炎症性疾患を含む様々な疾患の診断マーカーとなることが期待されている。そして、エクソソームやエクソソーム由来の分子をターゲットとする治療薬の開発も行われている。ベーチェット病においてもエクソソーム由来の分子が病態に関与していることが他の炎症性疾患の研究からも示唆されるが、ベーチェット病とエクソソームの関連についての研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ベーチェット病患者のエクソソーム由来 miRNA を対象に網羅的な発現解析を実行し、発症や各臨床症状と特異的に相関するエクソソーム由来 miRNA の探索を行い、ベーチェット病の早期の臨床症状診断・予後予測の確立を行う。近年、エクソソームが炎症性疾患の病態に関与していることが報告されている。エクソソームに含まれる miRNA などが細胞間のシグナル伝達を担っており、ベーチェット病の病態においてもこれらが関与している可能性が示唆されるが、これまでにエクソソームの研究の報告はない。そのため、本研究がベーチェット病で初めてのエクソソーム解析研究となり新規性が高い。

(2) また、ベーチェット病ではこれまでに遺伝子解析研究が盛んに行われてきた。それらはゲノムワイド関連解析研究 (GWAS) に代表されるように、一塩基多型 (SNP) を対象としたものが主であった。大規模な GWAS により病態の解明は大きく進んだものの未だに全容の解明には至っていない。本研究では、新たな視点からベーチェット病の発症メカニズム解明にアプローチするものであり、本研究で得られる知見は病態の解明以外にも予後予測因子となるバイオマーカーの発見や新規治療薬の開発にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) ベーチェット病患者および健常者のエクソソーム、miRNA の単離・抽出
ベーチェット病患者および健常者の血清から Total Exosome Isolation from Serum Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてエクソソームの濃縮・単離を行った。単離したエクソソームから Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて miRNA の抽出を行った。
- (2) エクソソーム由来の miRNA 発現解析
エクソソーム由来の miRNA を対象に、miRNA マイクロアレイ (SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ 8×60K) (Agilent Technologies 社) を用いて、ゲノム全域に位置する約 2,000 種類の mature-miRNA (成熟 miRNA、機能性 miRNA) の網羅的な発現解析を実行した。GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent Technologies 社) を用いてエクソソーム由来の miRNA の発現データを解析し、ベーチェット病患者および健常者における網羅的な miRNA 発現プロファイルを決定した。
- (3) ベーチェット病のバイオマーカーの探索
ベーチェット病患者群と健常者群の間で miRNA 発現プロファイルの比較を行った。ベーチ

ェット病患者群において特異的に有意に発現が増強または低下するエクソソーム由来の miRNA を同定し、ベーチェット病のバイオマーカーの候補とした。

さらに、ベーチェット病患者の臨床症状に着目し、症状の有無で分類したのち、「健常者群」と比較する（臨床症状を対象とした層別化解析）。症状別の層別化解析をすべての臨床症状（口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍、関節炎、精巣上体炎、消化器症状、血管病変、中枢神経病変）に対して行い、ベーチェット病の各々の臨床症状と有意に特異的に相関する miRNA を同定し、各臨床症状のバイオマーカーの候補を探索した。

(4) ベーチェット病の発症や症状との関連が示された miRNA 情報について、研究代表者らがこれまでに蓄積したゲノム情報と関連づけ、ベーチェット病の発症、重症度、臨床症状の形成に關与するパスウェイ（生物学的過程・経路）を網羅的に特定し、病態の解明を目指した。本解析では、研究協力者の Sezerman 教授が近年新たに開発した手法（Front Genet 2019, DOI: 10.3389/fgene.2019.00858）を用いて、各疾患の発症、重症度、臨床症状の形成と統計学的有意に相関を示すパスウェイを特定した。

(5) 本研究では、すべての血液検体提供者に対して、研究の目的、研究の期間と方法、研究参加により予測される効果及び危険性、研究に協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただいた。すべての血液検体提供者の個人情報 は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者によって厳重に管理されている。

(6) 本研究は、横浜市立大学の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会の審査・承認を得て実行した。

4. 研究成果

(1) ベーチェット病患者および健常者より取得した血清から、エクソソーム、miRNA の濃縮および単離を行った。単離したエクソソームから miRNA の抽出を行った。

(2) エクソソーム由来の miRNA を対象に、miRNA マイクロアレイを用いて、ゲノム全域に位置する約 2,000 種類の mature-miRNA の網羅的な発現解析を実行し、ベーチェット病患者および健常者における網羅的な miRNA 発現プロファイルを決定した。

(3) ベーチェット病のバイオマーカーの探索
ベーチェット病患者群と健常者群の間で miRNA 発現プロファイルの比較を行った。ベーチェット病患者群において特異的に有意に発現が増強または低下するエクソソーム由来の miRNA を複数同定した。これらの miRNA をベーチェット病のバイオマーカーの候補とした。さらに、ベーチェット病患者の臨床症状を診療録およびデータベースより抽出し、ベーチェット病の各症状の「有」「無」で分類したのち、「健常者群」と比較した。ベーチェット病の各々の臨床症状と特異的に相関する miRNA を探索し、各臨床症状のバイオマーカーの候補とした。

(4) これまでの方法によりベーチェット病の発症や症状との関連が示された miRNA 情報について、研究代表者らがこれまでに蓄積したゲノム情報と関連づけ、ベーチェット病の発症、重症度、臨床症状の形成に關与するパスウェイ（生物学的過程・経路）を網羅的に特定した。パスウェイ解析には、研究協力者の Sezerman 教授が開発した手法を用いて行った。疾患の発症、疾患重症度、臨床症状の形成と統計学的有意に相関を示すパスウェイを複数同定した。

(5) 本研究の成果は、ベーチェット病の発症や病態形成に関わるエクソソーム由来の miRNA を明らかとし、病態解明や効果的な治療標的の開発につながると考えている。当初より、台湾中山大学の許教授との共同研究の計画であったが、COVID-19 の影響で台湾の中山大学との共同研究が一時的に中断となったが、COVID-19 パンデミックの終息を待って共同研究を再開したところである。今後は日本人、台湾人の検体を用いて本研究結果の再現性の検討やそれぞれの人種に特異的なバイオマーカーの探索を行っていく。将来的には、ベーチェット病のバイオマーカーの同定による早期診断の実現、さらには患者個々のエクソソーム情報も踏まえた個別化医療の開発を目指していく。

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
研究協力者	目黒 明 (Meguro Akira)	横浜市立大学 (22701)	
研究協力者	水木 信久 (Mizuki Nobuhisa)	横浜市立大学 (22701)	
研究協力者	桐野 洋平 (Kirino Yohei)		
研究協力者	岳野 光洋 (Takeno Mitsuhiro)		

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			
その他の国・地域	中山医科大学			
トルコ	Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University			