

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790706

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝におけるマイクロRNAを標的分子とした診断・治療法の開発

研究課題名(英文)MicroRNA of the non-alcoholic steato-hepatitis

研究代表者

谷 丈二(Tani, Joji)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00596075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝は、年々増加に一途をたどり、非ウイルス性肝癌原因ととなっている。それらの原因をマイクロRNAを用いて解析し、その原因マイクロRNAを同定することで診断・治療への応用を試みた。2種類の非アルコール性肝炎モデルのマウスを用いて、マウスの肝からマイクロRNAを抽出し、進展等にかかわるマイクロRNAを同定した。また、メトホルミンやガレクチン9を投与することで変化するマイクロRNAを同定した。今後、非アルコール性肝炎患者の血清でマイクロRNAを同定することで応用を試みた。

研究成果の概要(英文)：NASH increases year by year, and NASH becomes the non-viral liver cancer cause. We analyzed those causes using microRNA and tried application to a diagnosis, treatment by identifying the cause micro RNA. Using the mouse of two kinds of non-alcoholic steato-hepatitis models, we extracted microRNA from the liver of the mouse and identified microRNA about extension. Also, we identified the microRNA which changed by giving metformin and galectin 9. We tried application in future by identifying microRNA with the serum of patients with non-alcoholic hepatitis.

研究分野：肝臓

キーワード：非アルコール性脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

近年肥満人口が増加し、メタボリックシンドロームが注目され、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型とされる非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) には、良好な経過をたどる単純性脂肪肝と肝硬変、肝癌へと至る非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) があり、近年 NASH から肝硬変、肝不全、さらに肝癌へと進展する例が増加の一途をたどっている。このため肝癌の新たな診断・治療、発生予防の開発を考慮するにあたり、肝癌の分子機構の解析だけではなく、NASH 発生母地である非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) による慢性肝炎、肝硬変の病態も併せ解析しなければならない。我々のグループは、10 年に渡り、肝発癌分子機構について研究を続け、肝癌における、癌遺伝子の活性化、細胞周期の破綻、血管新生分子の関与について検討し、現在それらの研究から、肝癌進展抑制のための分子標的治療薬になりうる候補分子を同定し、医師主導型の臨床試験前の動物実験を押し進めている。糖尿病薬であるメトフォルミンを動物実験で肝癌進展抑制効果を検討し、効果は見られるものの、満足できるものではない。よって新しい視点による肝癌の発生母地の NAFLD の解明もまた必要であると考えている。

2. 研究の目的

NAFLD/NASH (非アルコール性脂肪肝炎) モデルのマウスに対してメトフォルミンの投薬を行い、その肝組織の miRNA の網羅的解析を行い、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ことで、今後、肝炎・肝癌の発生・進展や診断・治療へ応用が期待され、医療経済効果のみならず副作用の軽減も含めたテーラーメイド医療の確立の寄与することが期待される。

(a) miRNA が搭載されたマイクロアレイを用いて、マウス正常肝、脂肪肝、脂肪肝炎組織およびヒト末梢血液における miRNA の発現を網羅的に解析し、発現プロファイルを作成後、クラスター解析をし、NAFLD/NASH において特異的に発現増強・減弱する miRNA を同定する。NAFLD/NASH において特異的に発現変化を起こしたマイクロ miRNA に関してその染色体の位置を調べ、その miRNA が、NAFLD/NASH と関連した LOH、欠失、増幅が観察されていた染色体上に位置しているかどうかを最新のゲノム情報を用い解析する。

(b) NAFLD/NASH において特異的に発現増強、減弱する miRNA のターゲット遺伝子予測を従来のターゲット遺伝子の予測

手法のみならず、最新のゲノム情報により、新規のターゲット遺伝子の予測を試みる。

(c) NAFLD/NASH において特異的に増強、減弱する miRNA の細胞内での機能解析を行う。目的の miRNA あるいは、抗-miRNA を各種細胞株に導入することにより、導入前後において、変化するタンパクの発現を、抗体アレイを用いて網羅的に解析し、影響を受ける特異的分子を同定する。

これらを用いて遂行することにより、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最終的な目的とする

3. 研究の方法

(1) マウス NAFLD/NASH 組織とヒト末梢血液からの全血遺伝子におけるアレイを用いたマイクロ RNA の網羅的解析 (1-a) サンプルの準備

miRNA の網羅的解析のために用いるマウス NAFLD/NASH 組織を、動物実験により集め、ヒト末梢血液は、外来または入院患者の血液検査時に集める。集められた組織・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で保存する。マウス肝組織・ヒト末梢血サンプルを各々 10 例の収集を目標とする。(1-b) アレイを用いたマイクロ RNA の網羅的解析

組織から miRNA を回収し (Ambion 社、mirVana™ miRNA isolation kit)、これをアレイ用のサンプルとする。アレイ (フィルゲン社、mirVana™ miRNA Bioarray V2, 662 種類の miRNA を搭載) に、標識 (Ambion 社、mirVana™ miRNA labeling kit) したサンプルをハイブリダイゼーション後、アレイ用スキャナーでスキャンを行う。その後解析ソフトウェア Array-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics, Inc. 本大学共同実験施設保有) を用いて得られたイメージ画像 (TIFF 画像, 16bit 形式) から、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、NASH・肝癌に特異的な miRNA を同定する。発現プロファイルの解析は、計算解析サーバ (Dell PowerEdge 2900) 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。また、クラスター解析には、教師なし階層的クラスタリングに加え、非階層的クラスタリング手法である

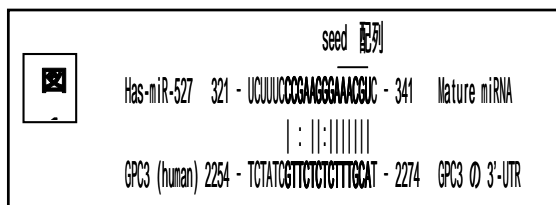
K-means、SOM (Self Organizing Map) や、精度の高い予測因子を絞り込むために教師あり学習分類である SVM (Support Vector Machine)、K-NN (K-Nearest Neighbor)などの方法を用いる(担当:岩間)。そして、肝癌の癌部、非癌部の組織・末梢血液においてそれぞれ独立したクラスターを形成するかどうかを確認する。また、NASH 組織・末梢血液においてそれぞれ独立するクラスターをつくるかどうかを確認し、さらに、NASH において特異的に変動する miRNA を同定する。すでに本研究申請書の目的の項目で述べたように、我々は、すでに 337 種類のアレイ盤である mirVana™ miRNA Bioarray を使用し、パイロットスタディーを行い、肝癌は、癌部・非癌部に比較して、統計学的有意に発現量の異なる miRNA を同定すると共に、階層的クラスタリングにより癌部・非癌部、明確に異なるプロファイルを示していた。これは、この実験システムが、稼働していることを示している。

NAFLD/NASH において特異的に発現変化がみられたマイクロ RNA の機能解析をする。

(1) NAFLD/NASH において特異的に発現増強、減弱するマイクロ RNA のターゲット遺伝子予測

NAFLD/NASH の組織と末梢血液による全血遺伝子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る。特に、seed 配列(micro RNA の 5' 側から数えて 2-8 番目の 7 塩基の配列)は、標的決定に極めて重要であるため、この seed 配列に着目しターゲット分子を絞り込む(担当:岩間)。この手法により、我々は、肝癌において減弱する miRNA-527 の 5' 末端が、肝癌の腫瘍マーカーとして期待されている glypican-3 の 3'UTR と seed 配列を持ち、glypican-3 は、miRNA-527 の標的遺伝子になる可能性を見いだした。実験的にもその予測は確認されている(正木の研究業績 3、第 10 回肝臓学会・第 48 回消化器病学

会合同、ワークショップ,2006、研究代表者正木が発表)。これと、同様な方法を使用し、NASH・肝癌に特異的に発現する miRNA のターゲット遺伝子を予測する。



(2) NAFLD/NASH にて特異的に発現増強、減弱するマイクロ RNA のターゲット遺伝子の実験的検証

たとえば、肝癌で減弱する 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検証する。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、課題研究で申請)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、siOORT™NEOFEX™ 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-miRT™-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。

(3) NAFLD/NASH にて特異的に発現増強、減弱するマイクロ RNA の癌細胞内での機能解析

NAFLD/NASH 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マイクロ RNA 活性を上げる合成 miRNA 前駆体分子 (Pre-miRT™mRNA Precursor Molecules, Ambion 社)あるいは、miRNA 活性を下げる合成 miRNA 阻害分子 (Anti-miRNA™ inhibitors Ambion 社)を肝癌細胞株に導入する。そして導入後、どの蛋白質に影響を与えたかを癌の進展に関連する血管新生分子あるいは、増殖因子レセプター分子、シグナル伝達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て NASH・肝癌において特異的に発現増強、

減弱する miRNA の直接、間接的に影響をあたえる血管新生、増殖因子レセプター、シグナル分子群を同定する。

(平成25年度の計画)

NAFLD/NASH モデルマウスを作成し、平成23～24年に得られた結果から、NAFLD/NASH を抑制すると予想される miRNA あるいは、anti-miRNA を投与することにより、NAFLD/NASH の改善を検討し、その miRNA が治療薬として使用できるかどうかを確認する。一般に NAFLD/NASH で増加している miRNA については、その anti-miRNA を減少している miRNA については、その miRNA を肝癌モデルに投与して、NAFLD/NASH の進展阻止に効果のある分子標的治療薬にならないかを検討する。

4. 研究成果

マウスにおける NASH の原因となる可能性のあるマイクロRNAを同定した。また、抗炎症作用のあるガレクチン9や抗糖尿病薬であるメトホルミンが脂肪抑制や肝炎の進展抑制のマイクロRNAを同定

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo

Koji Fujita Joji Tani

MicroRNA profiles following metformin treatment in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis

Akiko Katsura Joji Tani

[学会発表](計 2件)

メトホルミンによる NASH の進行抑制効果に関連する miRNA の網羅的解析

藤田浩二, 坂本鉄平, 前田瑛美子, 龍田美和, 桂 明子, 豊田由花, 三村志麻, 野村貴子,

谷 丈二, 三好久昭, 森下朝洋, 米山弘人, 樋本尚志, 正木 勉

第101回日本消化器病学会四国支部例会
第112回日本内視鏡学会四国支部例会

2014.6.14-15, 松山市

ポスターセッション NAFLD・NASH1

NASH に対するメトホルミンの有効性, その効果に関連するマイクロRNAの同定

桂 明子, 谷 丈二, 坂本鉄平, 平田修三, 龍田美和, 豊田由花, 三好久昭, 加藤清仁,

樋本尚志, 米山弘人, 小野正文, 正木 勉

第17回日本肝臓学会大会

2013.10.9-12, 東京都

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 谷 丈二
()

研究者番号: 00596075

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: