

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670369

研究課題名(和文)成熟miRNA上のSNPと臓器移植症例を利用した臓器特異的miRNA分泌の解析

研究課題名(英文)Identification of SNPs on mature micro RNA to analyze origin of miRNA

研究代表者

茶山 一彰(CHAYAMA, KAZUAKI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00211376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液中の成熟miRNA上に存在するSNPに注目し、このようなSNPを、未だ明らかにされていない、miRNAの産生臓器の一部を明らかにすることを目的として研究を行った。この研究を行うには、SNPが成熟miRNA上に存在すること、当該SNPを包含するmiRNAが血中に測定可能な量存在していること、SNPのminor allele frequencyが20%以上に存在することが必須であると考えられた。本研究ではそのようなSNPをスクリーニングし、有力な候補であるSNPをいくつか同定した。

研究成果の概要(英文)：Recent research made it clear that there are certain amount of circulating miRNA in serum, which present in serum associated with proteins such as AGO1 and AGO2. Such AGO-protein bound miRNA is quite stable and detectable by polymerase chain reaction after extraction from the serum samples and reverse transcription. We attempted to analyze organs which secrete each miRNA by analyzing circulating miRNA that is present in serum samples. To perform this analysis we tried to identify SNPs that is present in miRNA. We searched for such SNP in entire human genome analyzing human genome database and identified several candidate SNPs. Although we attempted to detect such miRNA with digital PCR, detection of small amount of miRNA was quite difficult. Further study is needed to detect such small amount of miRNA in serum samples.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 SNP digital PCR microRNA transplantation

1. 研究開始当初の背景

我々は血清中に存在する miRNA-122, miRNA-22 が B 型肝炎ウイルス感染患者血清で高度に増加していること、さらに、その血中濃度は肝炎の組織学的進行度、活動性とも高い相関性を有しており、バイオマーカーとして有用であることを明らかにしてきた (Arataki et al. *Journal of Medical Virology* 2013)。さらに、我々は Ago2 と HBc 抗原、HBs 抗原が肝細胞中で共局在し、B 型肝炎ウイルスの粒子形成に關与する可能性があることを明らかにした (Hayes et al. ***PLoS One*** 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、これらの研究経験を生かし、血液中の成熟 miRNA 上に存在する SNP に注目し、このような SNP を、未だ明らかにされていない、miRNA の産生臓器の一部を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

この研究を行うには、SNP が成熟 miRNA 上に存在すること、当該 SNP を包含する miRNA が血中に測定可能な量存在していること、SNP の minor allele frequency が 20%以上存在することが必須であると考えられた。本研究ではそのような SNP をスクリーニングし、有力な候補である SNP をいくつか同定した。

4. 研究成果

肝移植、腎移植、骨髄移植を受けた症例の移植後の血清の miRNA を Ion PGM と digital PCR で解析し、肝、腎、骨髄に由来する miRNA の動態を明らかにすることを予定していたが、Digital PCR で予期せぬ非特異反応が起こり、正確な微量の miRNA の検出が困難であることが明らかになった。現在この問題を克服すべく検討を行っている。

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 14 件)

1. Yokoyama S. Kawakami Y, and Chayama K, Letter: Pitavastatin supplementation of PEG-IFN/ribavirin improves sustained virological response against HCV. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014; 39: 443-4. 査読有 doi:

10.1111/apt.12605.

2. Kumada H. Suzuki Y. Ikeda K. Toyota J. Karino Y. Chayama K. Kawakami Y. Ido A. Yamamoto K. Takaguchi K. Izumi N. Koike K. Takehara T. Kawada N. Sata M. Miyagoshi H. Eley T. McPhee F. Damokosh A. Ishikawa H, and Hughes E, Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*, 2014. in press. 査読有 doi: 10.1002/hep.27113
3. Suzuki Y. Ikeda K. Suzuki F. Toyota J. Karino Y. Chayama K. Kawakami Y. Ishikawa H. Watanabe H. Hu W. Eley T. McPhee F. Hughes E, and Kumada H, Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol*, 2013; 58: 655-62. 査読有 doi:10.1016/j.jhep.2012.09.037.
4. Shi N. Hiraga N. Imamura M. Hayes C N. Zhang Y. Kosaka K. Okazaki A. Murakami E. Tsuge M. Abe H. Aikata H. Takahashi S. Ochi H. Tateno-Mukaidani C. Yoshizato K. Matsui H. Kanai A. Inaba T. McPhee F. Gao M, and Chayama K, Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut*, 2013; 62: 1055-61. 査読有 doi: 10.1136/gutjnl-2012-302600.
5. Onoyama M. Kitadai Y. Tanaka Y. Yuge R. Shinagawa K. Tanaka S. Yasui W, and Chayama K,

- Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer. *Neoplasia*, 2013; 15: 1391-9. 査読有 doi:10.1593/neo.131668.
6. Nakano Y. Chayama K. Ochi H. Toshishige M. Hayashida Y. Miki D. Hayes C N. Suzuki H. Tokuyama T. Oda N. Suenari K. Uchimura-Makita Y. Kajihara K. Sairaku A. Motoda C. Fujiwara M. Watanabe Y. Yoshida Y. Ohkubo K. Watanabe I. Nogami A. Hasegawa K. Watanabe H. Endo N. Aiba T. Shimizu W. Ohno S. Horie M. Arihiro K. Tashiro S. Makita N, and Kihara Y, A nonsynonymous polymorphism in semaphorin 3A as a risk factor for human unexplained cardiac arrest with documented ventricular fibrillation. *PLoS Genet*, 2013; 9: e1003364. 査読有 doi:10.1371/journal.pgen.1003364.
 7. Miki D. Ochi H. Takahashi A. Hayes C N. Urabe Y. Abe H. Kawaoka T. Tsuge M. Hiraga N. Imamura M. Kawakami Y. Aikata H. Takahashi S. Akuta N. Suzuki F. Ikeda K. Kumada H. Karino Y. Toyota J. Tsunoda T. Kubo M. Kamatani N. Nakamura Y, and Chayama K. HLA-DQB1*03 confers susceptibility to chronic hepatitis C in Japanese: a genome-wide association study. *PLoS One*, 2013; 8: e84226. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0084226.
 8. Mikami S. Nakashima A. Nakagawa K. Maruhashi T. Iwamoto Y. Kajikawa M. Matsumoto T. Kihara Y. Chayama K. Noma K. Ochi M. Nishimura M. Tsuji K. Kato Y. Goto C, and Higashi Y, Autologous bone-marrow mesenchymal stem cell implantation and endothelial function in a rabbit ischemic limb model. *PLoS One*, 2013; 8: e67739. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0067739.
 9. Lo P H. Urabe Y. Kumar V. Tanikawa C. Koike K. Kato N. Miki D. Chayama K. Kubo M. Nakamura Y, and Matsuda K, Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One*, 2013; 8: e61279. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0061279.
 10. Lange C M. Miki D. Ochi H. Nischalke H D. Bojunga J. Bibert S. Morikawa K. Gouttenoire J. Cerny A. Dufour J F. Gorgievski-Hrisoho M. Heim M H. Malinverni R. Mullhaupt B. Negro F. Semela D. Kutalik Z. Muller T. Spengler U. Berg T. Chayama K. Moradpour D. Bochud P Y. Hiroshima Liver Study G, and Swiss Hepatitis C C S G, Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PLoS One*, 2013; 8: e64053. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0064053.
 11. Kitamoto T. Kitamoto A. Yoneda M. Hyogo H. Ochi H. Nakamura T. Teranishi H. Mizusawa S. Ueno T. Chayama K. Nakajima A. Nakao K. Sekine A, and Hotta K,

- Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum Genet*, 2013; 132: 783-92. 査読有 doi:10.1007/s00439-013-1294-3.
12. Karino Y. Toyota J. Ikeda K. Suzuki F. Chayama K. Kawakami Y. Ishikawa H. Watanabe H. Hernandez D. Yu F. McPhee F, and Kumada H, Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol*, 2013; 58: 646-54. 査読有 doi:10.1016/j.jhep.2012.11.012.
 13. Hashiba M. Ono M. Hyogo H. Ikeda Y. Masuda K. Yoshioka R. Ishikawa Y. Nagata Y. Munekage K. Ochi T. Hirose A. Nozaki-Fujimura Y. Noguchi S. Okamoto N. Chayama K. Suganuma N, and Saibara T, Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 2013; 8: e76161. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0076161.
 14. Abe Y. Aly H H. Hiraga N. Imamura M. Wakita T. Shimotohno K. Chayama K. and Hijikata M, Thromboxane A2 synthase inhibitors prevent production of infectious hepatitis C virus in mice with humanized livers. *Gastroenterology*, 2013; 145: 658-67 e11. 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.014.
- (学会発表)(計7件)
1. 茶山一彰, New Treatment Paradigms for HCV: The Basics, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014 (APASL 2014) (アジア太平洋肝臓病学会議)、2014/3/12、ブリスベン(オーストラリア)
 2. 茶山一彰, Optimizing triple therapy, and IFN/RBV free regimens, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2014 (APASL 2014) (アジア太平洋肝臓病学会議)、2014/3/12、ブリスベン(オーストラリア)
 3. 茶山一彰, HCV Genotype, Variations Associated with IFN and DAA Resistance, Conference Taiwan Association for the Study of the Liver(TASL)2013、2013/12/21、台湾
 4. 茶山一彰, HCV in Asia IFN-free Regimen for Chronic Hepatitis C in Asia: A Phase study in Japanese HCV Genotype 1b Patients, Conference Taiwan Association for the Study of the Liver(TASL)2013、2013/12/21、台湾
 5. 茶山一彰, All-oral Combination of Daclatasvir Plus Asunaprevir in Interferon Ineligible Naïve/Intolerant and Nonresponder Japanese Patients Chronically Infected with HCV Genotype 1b: Results from a Phase 3 Trial, The 64th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases 2013(AASLD)、2013/11/15、ワシントン D.C.(U.S.A.)
 6. 茶山一彰, Treatment of Chronic Hepatitis C with First Generation Protease Inhibitors in Asian

Population:Telaprevir-Based Triple Therapy in Japanese Population、TDDW2013(Taiwan Digestive Disease Week2013)、2013/10/5、台北(台湾)

7. 茶山一彰、Studies on Hepatitis Viruses using human hepatocyte chimeric mice、第17回国際肝類洞壁研究シンポジウム(17th ISCHS)、2013/9/25、大阪
- 〔図書〕(計 12件)
1. 今村道雄, 平賀伸彦, 茶山一彰、メディカルレビュー社、The Lipid、2.エゼチミブ、2013、20-24
 2. 茶山一彰, 越智秀典, 三木大樹、一般財団法人 日本消化器病学会、日本消化器病学会雑誌、肝疾患の疾患関連遺伝子-GWAS を含めた最近の知見から、2013、1-14
 3. 茶山一彰、医学書院、専門医のための消化器病学会、B型1肝炎治療 ↓2013、339-344
 4. 茶山一彰, 越智秀典, 三木大樹、一般財団法人 日本消化器病学会、日本消化器病学会雑誌、肝疾患の疾患関連遺伝子-GWAS を含めた最近の知見から、2013、1577-1590
 5. 相方 浩, 兵庫秀幸, 茶山一彰、中外医学社、肝臓診療 Q&A、"最近肝臓の背景病態(B型・C型・NASHなど)に変化が起きているか?"、2013、1-5
 6. 兵庫秀幸, 茶山一彰、文光堂、hepatology Practice 第1巻 B型肝炎の診療を極める、治療編 4.薬物療法の基本方針 C 薬物療法:合併症の治療、2013、191-195
 7. 柘植雅貴, 茶山一彰、文光堂、hepatology Practice 第1巻 B型肝炎の診療を極める、B型肝炎を理解す

るための基礎研究 4.HBV の感染実験系、2013、185-193

8. 川上由育, 茶山一彰、メディカルレビュー社、Pharma Medica、C型肝炎インターフェロン・フリー 抗ウイルス治療の展望、2013、31-35
9. 小林知樹, 川上由育, 平松 憲, 瀧川英彦, 野中裕広, 田中未央, 苗代典昭, 中原隆志, 本田洋士, 宮木大輔, 長沖祐子, 河岡友和, 高木慎太郎, 柘植雅貴, 今村道雄, 兵庫秀幸, 相方 浩, 高橋祥一, 茶山一彰、"一般社団法人日本肝臓学会"、肝臓、ゲノタイプ 3a型のC型急性肝炎の1例 IL28B 遺伝子からの考察、2013、120-127
10. 今村道雄, 茶山一彰、ヴァンメディカル、消化器の臨床、B型慢性肝炎、2013、581-588
11. 今村道雄, 平賀伸彦, 茶山一彰、メディカルレビュー社、The Lipid、【代謝循環器系薬剤の多面的作用】エゼチミブ、2013、128-132
12. 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰、科学評論社、消化器内科、【C型慢性肝炎の新たな治療展開】IL28B 遺伝子多型からみた3剤併用療法に対する難治性要因、2013、460-464

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

広島大学病院消化器・代謝内科ホームページ

http://home.hiroshima-u.ac.jp/naika1/research_profile/liver_lab/

6．研究組織

(1)研究代表者

茶山 一彰 (CHAYAMA KAZUAKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号： 00211376

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：