

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461005

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎進展に関与するmicroRNAの同定とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)A Series of microRNA in Related to Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

研究代表者

孝田 雅彦 (Koda, Masahiko)

鳥取大学・医学部・医員

研究者番号：20243389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常およびSS、NASHモデルマウス肝内のmiRNA発現を、マイクロアレイ法により網羅的に解析し、ヒトとマウスで共通に発現しているmiRNA 28個を選択した。28個のmiRNAについて発現強度の再現性を確認するため、新たな4個体の肝組織からmiRNAを抽出しRT-PCRを用いて確認した。miR-379は、NAFLにおいて特に強く発現していた。また、NASHにおいて、その発現強度は血清総コレステロールおよびLDL-Cと正の相関があり、進展度の低い群で明らかであった。Dlk1-Dio3 matクラスターmiRNAのNAFLDへの影響が明らかになり、臨床応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim was to use animal models and human samples to examine the relationship between miRNA expression and each type of NAFLD (SS and NASH). DD Shionogi, Fatty Liver Shionogi (FLS) and FLS ob/ob mice were used as models for normal control, SS and NASH, respectively. Fourteen miRNAs showed clear expression differences among liver tissues from SS, NASH, and control mice with good reproducibility. Among these NAFLD candidate miRNAs, seven showed similar expression patterns and were upregulated in both SS and NASH; these seven candidate miRNAs mapped to an miRNA cluster in the 14q32.2 maternally imprinted region delineated by delta-like homolog 1 and type III iodothyronine deiodinase (Dlk1-Dio3 mat). Serum samples from patients with SS or NASH differed markedly with regard to expression of the putative Dlk1-Dio3 mat miRNAs, and these differences accurately corresponded with NAFLD diagnosis. The expression profiles of seven miRNAs in 14q32.2 mat have high potential as biomarkers for NAFLD.

研究分野：非アルコール性脂肪肝炎

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 非アルコール性脂肪肝 miRNA

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) はメタボリックシンドローム (MS) の肝における表現型であり、肝硬変、肝癌へ進展する重篤な病態である。これまで申請者はヒト NASH に最も類似した NASH モデルマウスとして FLS-*ob/ob* マウス、単純性脂肪肝 (SS) モデルとして FLS マウスについて詳細な報告を行ってきた (HepatoI Res, 2013)。FLS-*ob/ob* マウスは肥満、糖尿病、高脂血症をもち、肝組織では高度の脂肪沈着とともに明らかな線維化を認め、48 週では肝硬変、肝癌に至る極めてヒト NASH に類似したモデルである。また、FLS マウスは肝での軽度から中等度の脂肪沈着を認めるが、線維化は軽度でありヒト SS、あるいは mild NASH に相当するモデルである。また、これらのモデルを用いてどのような薬物が NASH に有用か、またその作用機序は何かを検討し報告してきた (HepatoI Res 2010, Int J Mol Med 2012, HepatoI Res 2013)。ヒトの NAFLD において SS から NASH に進展する因子としてインスリン抵抗性や酸化ストレスが関与していることは多くの研究から明らかとなっており、FLS-*ob/ob* マウスにおいても同様の機序が関与していることを報告した (HepatoI Res, 2013)。

近年、miRNA は遺伝子転写後のタンパク発現制御を行い、様々な病態を促進あるいは抑制することが明らかとなってきた。しかし、正常肝から SS、SS から NASH へ進展する過程における miRNA の研究は未だ十分ではない。本研究ではまずこれまで申請者が研究し保持している DS マウス (FLS マウスの元となった正常肝マウス)、FLS マウス、FLS-*ob/ob* マウスにおける miRNA 発現プロファイリングをマイクロアレイ法によって網羅的に検討することによって病態進展に関与する miRNA を同定し、これらの miRNA が制御するタンパクがわかれば NASH 病態解明の一助となる。さらに、この miRNA をバイオマーカーとして

用いることができれば NASH の診断、治療に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに本研究は NASH においてどのような miRNA が病態に関与しているかを明らかにする。また、選択された miRNA とヒトの相同 miRNA をヒト血清で測定し、ヒト NASH のバイオマーカーとして臨床応用に展開するための研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

DS マウス、FLS マウス、FLS-*ob/ob* マウスの肝組織中の miRNA 発現差を RT-PCR array 法で網羅的に解析し、マウスにおける NASH 進展に関わる miRNA 群を抽出し、RT-qPCR 法によって確認する。

- (1) 選択された miRNA がどのようなタンパク発現を制御して NASH 進展のメカニズムに関わっているか、複数の異なる標的蛋白予測プログラムとオントロジーデータマイニングを用いて予測する。
- (2) マウスで確立された NASH 関連 miRNA のうち、ヒトと相同の miRNA について、ヒト血清内での発現量測定方法を確立する。
- (3) 肝生検で確定診断された NASH 患者、SS 患者血清より、これら miRNA 発現量を測定し、NASH 診断、特に SS との鑑別診断に有用か検討する。

3. 研究の方法

本研究計画では

- (1) マウスモデルを用いて NASH 進展に関する miRNA をマイクロアレイ法、RT-qPCR 法を用いて同定し、それらが制御している一連の蛋白を明らかにする。
- (2) マウスモデルで確立した NASH 関連 miRNA を、NASH 患者血清で測定し、ヒト NASH 診断バイオマーカーとしての有用性を明らかにする。

NASH 進展に関与している miRNA の同定

本研究では正常肝の DS マウス、SS モデルである FLS マウス、NASH モデルである FLS-*ob/ob* マウスの肝より発現量の異なる miRNA 群を同定する。

1. NASH 関連 miRNA の網羅的探索

DS、FLS、FLS-*ob/ob* マウス肝組織内の miRNA 発現プロファイルを、Taqman プローブを用いたリアルタイム定量 PCR アレイ法で網羅的に解析し、各病態間で、発現量に強い変化を示す miRNA を Fold change ranking 法で抽出する。Fold change ranking 法は、異なる解析手法による結果の再現性を確保するのに有効である。抽出された miRNA を RT-qPCR 法によって同様の結果が得られるか確認する。

2. NASH 関連 miRNA 群が干渉する候補蛋白の検索

1. によって抽出された NASH 関連候補 miRNA それぞれが制御している標的蛋白について、コンピュータを用いて推測する。mRNA との配列相同性などを元に計算される予測データは未だに完全ではないため、精度を上げるために 3 種の異なるアルゴリズムを持つコンピュータープログラム (miRBASE, Target Scan, DIANA microT) を用い、交差法で候補蛋白を絞り込む。また、一般的に miRNA は数百から数千の標的蛋白発現に干渉するため、オントロジー利用パスウェイ予測プログラム (DIANA microPath) を用いて蛋白機能による絞り込みを行う。

ヒト NASH 診断のバイオマーカーとなる miRNA の同定

-1 に確立した NASH 関連 miRNA において、マウスとヒト間で相同の miRNA について、ヒト血清中の発現定量が可能であるか、また、ヒト NASH 病態との関連について検討する。

1. ヒト血清から miRNA 測定方法の確立

miRNA はエクソソームによって細胞外分泌されており、極微量の miRNA (血液内 RNA の

約 1%) が循環血液中にも存在している。多くの疾患に関して、体液内 miRNA 発現量測定が検討されているが、一般に臨床で広く検査に用いられる血清は、血漿と比較して miRNA 含有が少ないことが知られており、しばしば検出困難が報告されている。我々は短鎖 RNA 回収に優れた市販カラムを使用するだけでなく、ファージ RNA を用いたマスク法による回収効率の向上、すでに血清内 miRNA 予測濃度とした人工合成スパイクイン miRNA および、血中に比較的安定発現が報告されている miRNA について、正確な検量線を得ることに成功しており、測定の目処は立っている。また、NASH 関連 miRNA の血中発現量が特に低い場合は、プレアンプ PCR 併用による感度増強を行い、安定した測定系を確立する。

2. ヒト NASH と SS 患者の血清 miRNA 発現差による NASH 診断能の解析

1. において血清発現量を測定可能となった NASH 関連 miRNA を、肝生検にて確定診断された NASH 患者、SS 患者血清において検討し、NASH 診断、特に SS との鑑別診断に有用か検討する。診断バイオマーカーとしての有用性については ROC 解析を用いる。

4. 研究成果

(1) NASH 進展に関与している miRNA の同定

正常および NAFL、NASH モデルマウス肝内の miRNA 発現を、ほ乳類間で良く保存されている miRNA 375 個を選抜し、マイクロアレイ法により網羅的に解析した。測定された発現強度を、1 : NAFLD のいずれかにおいて正常との間で大きな変動がみられたもの (NAFLD への進展)、2 : NAFL と NASH 間で発現変動があるもの (NASH への進展) の、二つの概念で抽出した結果、32 個の miRNA が、初期候補として抽出された。これらについて miRNA データベース miRBase を用いて、ヒトとマウスで共通に発現している miRNA 28 個を選択した。

28個のmiRNAについて発現強度の再現性を確認するため、それぞれの群で新たな4個体から得た肝組織でのmiRNA発現をRT-PCRを用いて検討したところ、14個が平均発現強度において選択基準を満たし、これらをNASH関連候補miRNAとした。

これらの中には、既にNASH発症と関連が報告されているmiR-34aおよびmiR-200ファミリーが含まれており、これらの先駆研究を追認できた。また、今まで報告の見られていない一連のmiRNAのうち、7個のmiRNA(miR-127, -136, -376c, -379, -409-3p, -411, -495)は、他候補と異なり、NAFLとNASHモデル双方で比較的強い発現上昇が認められた。プロモーターを共有するmiRNAクラスターについて検討したところ、これら7個のmiRNAは全て14番染色体のMaternal imprinted Dlk1-Dio3(Dlk1-Dio3 mat)クラスター上に存在することが判明した。同クラスターについては、選択的機能不全を導入したマウス新生児が、致死的低血糖に陥ることが示されている。また、ヒトにおいて、同クラスターの過剰発現がおきる先天性疾患 maternal uniparental disomy for chromosome 14では、幼少期から中心性肥満が認められ、同クラスターがエネルギー産生に関連していることが示唆されている。

次に、これら候補miRNAの標的遺伝子について、ソフトウェアによる予測を行った。ほぼすべての候補miRNAが、NASHへの進展、もしくは進展予防に関与するとされる遺伝子を標的としていると予測された。特にDlk1-Dio3 mat 候補miRNAについてみると、他候補miRNAと異なり、TGF- β pathway およびエネルギー代謝に関連する Insulin-like growth factor、5' adenosine monophosphate activated protein kinase を高頻度に標的とし、NASH病態の一端を担うものと考えられた。

(2) ヒトNASH診断のバイオマーカーとなるmiRNAの同定

ヒトへの応用に関して、肝生検によって診断されたNAFL、NASH患者、および健常対照者それぞれ10例の血清内候補miRNA発現を検討した。研究に関して、鳥取大学の倫理委員会の承諾を得たうえで(承認番号2374)文書による説明と同意を得た。候補miRNAのヒト血清内発現プロファイルを検討すると、NAFLとNASHの間で明瞭な発現パターンの相違が見られ、マウス肝における候補miRNA群が、ヒト血清においても疾患指標になることが示された。

Dlk1-Dio3 mat 候補miRNA群のみにおいてサブ解析も施行したが、miRNA発現とNAFL、NASHの診断に関するROC解析においてAUROC 0.91-0.93と良好な診断能が示された。また、Dlk1-Dio3 mat 候補miRNA血清内発現レベルと、NASH患者臨床所見との関連を線形解析したところ、miR-127と血小板数、miR-379とTotal cholesterol、miR-495と血小板数およびHDL-Cholesterolにおいて有意な関連が認められ、脂質代謝と肝線維化に影響していることが示唆された。

NAFLD診断、進行度予測、治療への臨床応用に向けて、血清中のDlk1-Dio3 mat クラスター内miRNAの発現検討を進めた。検討対象は、クラスター内において、パイロット研究において、健常者とNAFLD患者との血清内で最も大きな発現差が認められ、かつ臨床所見との関連が認められた、miR-379とした。出来るだけ多数の検体を集めるため、多施設での共同研究を行った。各施設倫理委員会の許可を得て、肝生検と同時に採取された、NAFLD患者80例の血清内miR-379の発現をTaqman RT-PCRにて解析し、肝組織の脂肪化および線維化進展度、臨床所見との関連について検討した。健常者との比較において、NAFL患者では血清内miR-379の発現が有意に上昇しており、NASH患者でも上昇傾向が見られたが、こちらにおいては、有意差は見られなかった。また、NAFLとNASH患者血清の間に、有意な

miR-379 発現差は見られなかった。次に、血清内 miR-379 発現と、NAFLD 患者の臨床所見との比較検討を行うと、パイロット研究での結果と同じく、血清総コレステロールと、そして、新たに LDL-C との間に正の相関が見られた。この傾向は、NASH の組織学的進展度 Brunt stage が 0 もしくは 1 群でさらに明らかとなった。

結論として、miR-379 は、広い疾患スペクトルを持つ NAFLD のうち、NAFL において特に強く発現していた。また、NASH において、その発現強度は血清総コレステロールおよび LDL-C と正の相関があり、疾患進展度の低い群において特に明らかであった。今後更に多数での検討を行うことで、Dlk1-Dio3 mat クラスター miRNA の NAFLD への影響が明らかになり、臨床応用への可能性が示唆された。

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 1 件)

Okamoto K, Koda M, Okamoto T, Onoyama T, Miyoshi K, Kishina M, Kato J, Tokunaga S, Sugihara TA, Hara Y, Hino K, Murawaki Y. A Series of microRNA in the Chromosome 14q32.2 Maternally Imprinted Region Related to Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Mouse Model. PLoS One. 査読あり 2016, 2;11(5):e0154676. doi: 10.1371/journal.pone.0154676.

[学会発表](計 5 件)

岡本欣也 孝田雅彦 岡本敏明 斧山巧 木科学 加藤順 徳永志保 杉原誉明 村脇義和 Maternal imprinted Dlk1-Dio3 miRNA クラスターの NASH 発症、進展に及ぼす影響 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 5 月 19 日 ホテルニューオータニ幕張 千葉県千葉市

岡本欣也 岡本敏明 斧山巧 木科学 加藤順 徳永志保 杉原誉明 孝田雅彦 村脇義和 マウスモデル肝での検討で予測された非アルコール性脂肪肝炎発症、進展に関連する miRNA 群のヒト血清内発現 第 23 回肝病態生理研究会 2015 年 5 月 20 日 ホテル日航熊本 熊本県熊本市

岡本欣也 岡本敏明 斧山巧 木科学 加藤順 徳永志保 杉原誉明 孝田雅彦 村脇義和 非アルコール性脂肪肝炎発症、進展に関連するヒト血清 miRNA 発現 第 101 回 日本消化器病学会総会 2015 年 4 月 23 日 仙台国際センター 宮城県仙台市

岡本欣也 岡本敏明 斧山巧 木科学 加藤順 徳永志保 杉原誉明 孝田雅彦 村脇義和 非アルコール性脂肪肝炎発症に関連する miRNA の網羅的検索 第 22 回日本消化関連学会週間 2014 年 10 月 23 日 神戸国際展示場 兵庫県神戸市

Kinya Okamoto, Toshiaki Okamoto, Takumi Onoyama, Kenichi Miyoshi, Manabu Kishina, Jun Kato, Shiho Tokunaga, Takaaki Sugihara, Yuichi Hara, Masahiko Koda, Keisuke Hino, Yoshikazu Murawaki MICRORNA EXPRESSION PROFILE IN SIMPLE STEATOSIS AND NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS 22nd United European Gastroenterology Week 2014年7月24日 Vienna, Austria

[図書](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

孝田 雅彦 (KODA, Masahiko)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：20243389

(2) 研究分担者

法正 恵子 (HOSYO, Keiko)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：20379621
下廣 寿 (SHIMOHIRO, Hisashi)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：90583758
岡本 欣也 (OKAMOTO, Kinya)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：20464282
杉原 誉明 (SUGIHARA, Takaaki)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60753853
的野 智光 (MATONO, Tomomitu)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60571841

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：

(4) 研究協力者

(0)