血清中 microRNA を用いた臨床及び非臨床における新規バイオマーカーの確立に向けた研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00061304

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



学位論文要旨

Circulating microRNAs (miRNAs) have been acknowledged for their potential as disease markers. This study aimed to investigate if circulating miRNA could be biomarkers to distinguish different types of liver diseases or to detect drug-induced skeletal muscle injuries. In the study for the liver injury, serum miRNA profiles in 28 patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis or drug-induced liver injury as well as 4 control subjects were determined by TaqMan MicroRNA array analysis. As the result, 37 miRNAs whose levels were significantly different between any of the groups were identified, and it was found that their profiling by PCA could distinguish different types of liver disease. In the study for the skeletal muscle injury, serum miR-206 level from rats with skeletal muscle injury by treatment of a muscle toxicant as well as four in-house compounds were measured. It was demonstrated that serum miR-206 level was significantly increased with skeletal muscle injury, and that its specificity for detection of skeletal muscle injury was higher than conventional markers. Taken together, it was demonstrated that circulating miRNA could distinguish different types of liver diseases in clinical and detect drug-induced skeletal muscle injury in nonclinical study. (200 words)

MicroRNAs (miRNAs) はタンパク質をコードしない 22 塩基程度の小さな RNA である。ヒトで 2,600 種類、マウスで 1,900 種類、ラットで 700 種類以上同定されており、同じ番号が付与されている miRNAs の塩基配列は種で保存されている。miRNAs は標的 mRNA に結合して分解を促進もしくはタンパク質への翻訳を抑制することで、標的遺伝子の発現を負に制御する機能を有しており、発生や分化などの多彩な生命現象や様々な疾患の発症や進行に関与することが明らかになっている。miRNAs が血中に存在しており、中でも miR-141 は健常人と比較して前立腺がん患者で有意に高い値を示すことが 2008 年に報告された。この報告以降、がんに加え、糖尿病や心不全など様々な疾患において、miRNAs がバイオマーカーとなる可能性が報告されている。本研究では、臨床において血中パラメーターでは原因や病態の分類が困難な肝障害に対して、また医薬品開発における非臨床毒性試験で血中パラメーターでの検出に課題のある薬剤性骨格筋障害に対して、血中 miRNAs がバイオマーカーとなるか明らかにすることを目的とした。

肝障害はウイルス感染、薬物投与、高脂肪食、アルコール摂取など様々な要因により引き起こされる。医薬品の服用が原因となる肝障害は肝細胞障害型、胆汁うっ滞型および混合型に分類され、高脂肪食やアルコール摂取による肝障害は肝炎または脂肪肝や脂肪性肝炎から肝線維症、肝硬変および肝癌と病態や進行の程度により区別される。肝障害の診断には、血中マーカーとして肝細胞からの逸脱酵素である alanine aminotransferase (ALT) や aspartate aminotransferase (AST)、胆道系酵素である alkaline phosphatase (ALP)、total bilirubin (T-Bil) などが用いられているが、飲酒や運動、心疾患によっても上昇することが知られており、肝障害を特異的に検出しているとは言いきれない。また、これらの血中マーカーでは肝障害の部位や病型の特定を行うことは不可能である。従って、様々な肝障害を分類できる血中マーカーの開発が急務である。近年、ある一種類の肝障害患者と健常人での血中 miRNA の変化を比較し、バイオマーカーとして利用可能か評価している文献が多く報告されている。このような評価の場合、報告された miRNA は他の肝障害でも変動している可能性があり、当該肝障害の特異的なバイオマーカーとして利用可能かどうかは検証が必要である。一方、筆者らは過去の検討において、薬剤性肝障害 (肝細胞壊死型および胆汁うっ滞型)、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝線維症のモデルラットを作成し、血漿中 miRNA の網羅的発現変動解析を行うことで、肝障害の病型によって血漿中 miRNA 発現プロファイルが異なることを明らかにしている。そこで、本研究では、ヒトにおいても血中 miRNA が種々の肝障害を分類可能なバイオマーカーとなるかどうか明らかにすることを目的とした。

B 型肝炎 (n = 6)、C 型肝炎 (n = 4)、原発性胆汁性肝硬変 (n = 3)、自己免疫性肝炎 (n = 3)、NASH (n =5) または薬物性肝障害 (n =7) に罹患した計 28 名の患者および対照群として 4 名の肝臓に異常が認められないヒトの血中 miRNA の網羅的な発現変動解析を TaqMan microRNA array (計 664 プローブ) を用いて行った。その結果、検出された miRNA のうち、40-Ct 値がメーカー推奨のカットオフ値である 8 以上の値を示した数は 37 – 135 と、個人で異なることが示された。なお、40-Ct 値が 8 以下の miRNA は、非特異的な増幅が反映されている可能性があるため、40-Ct 値を 0 として以降の解析に用いた。測定した全 miRNA のうち、1 つ以上の検体においてカットオフ値以上の発現量を示したものを抽出したところ 201 種類存在し、そのうち対照群および各肝障害群のいずれかの群間で発現量に有意差が認められる miRNA は 37 種類であった。これら 37 miRNAs の多くは複数の肝障害群で類似した発現量を示したことから、肝障害の種類を分類するバイオマーカーとして特定の miRNA を単独で利用するのは困難と考えられた。次に、これらの miRNAs について主成分分析を用いて発現プロファイルを評価した。主成分分析では、多くの変数により記述された量的データについて、変数間の相関を排除し、総合指標となる合成変数を新たに作成する。各検体の第一主成分 (principal component 1, PC1)、第二および第三主成分として作成された各変数を、それぞれ X、Y および Z 軸にプロットしたところ、肝障害群と対照群が離れた位置にプロットされた (Fig. 1A) 。従って、肝障害患者と健常人を分類できることが明らかとなった。しかしながら、B 型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、NASH および薬物性肝障害群が比較的近い位置にプロットされたことから、これらの肝障害における 37 miRNAs の発現プロファイルは類似しており、PC1、2 および PC3 の変数

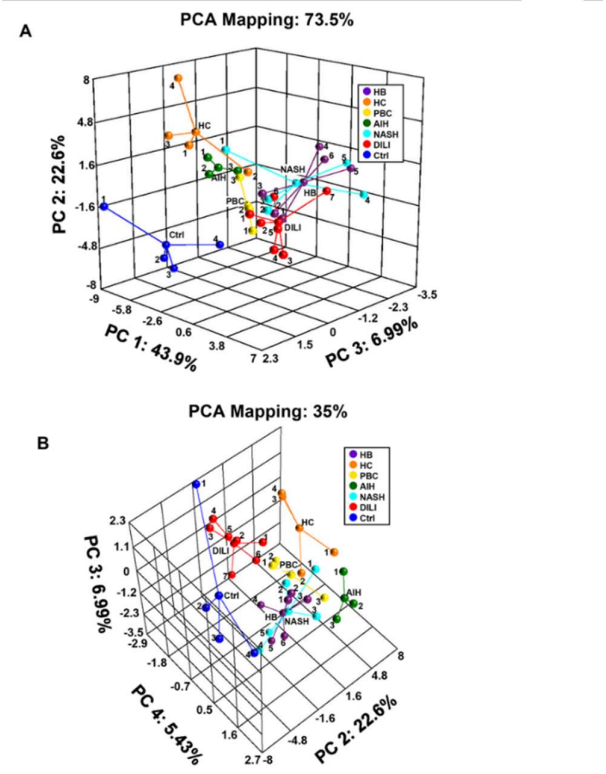


Fig. 1. PCA of serum miRNA expression in 6 hepatitis B (HB), 4 hepatitis C (HC), 3 primary biliary cirrhosis (PBC), 3 autoimmune hepatitis (AIH), 5 non-alcoholic steatohepatitis (NASH), 7 drug-induced liver injury (DILI), and 4 control (Ctrl). PCA was performed using 37 miRNAs that exceeded the cut off value in all subjects (n = 32). (A) A three-component model was developed that explained a total of 73.49% (PC1, 43.9%; PC2, 22.6%; PC3, 6.99%) of the variability of the data. (B) A three-component model was developed that explained a total of 35.02% (PC2, 22.6%; PC3, 6.99%; PC4, 5.43%) of the variability of the data. Each ball representing an individual is connected to the centroid of each group. The numbers near the balls represent the subject number.

では肝障害の病型を区別するのは困難であることが判明した。次に、PC2、3 および 4 をプロットしたところ、B 型肝炎と NASH 群が比較的近くにプロットされたものの、他の肝障害群は離れた位置にプロットされた (Fig. 1B)。従って、PC2、3 および 4 の成分を用いることで、各肝障害を区別可能であることが示された。以上の結果から、本研究で見出された 37 miRNAs を用いた主成分分析により、ヒト肝障害の病型・病因を診断できる可能性が示された。

骨格筋障害は市場撤退となり得る副作用の一つであることから、医薬品開発において重篤な骨格筋障害リスクの早期検出が求められている。現在、臨床および非臨床で骨格筋疾患/障害のバイオマーカーとして用いられている血中の creatine kinase (CK) もしくは lactate dehydrogenase (LDH) は、運動や加齢、筋肉量、妊娠、飲酒、心筋や脳、肝臓などの他臓器の疾患によって上昇することが知られており、骨格筋障害を特異的に検出しているとは言いきれない。近年、骨格筋に存在する skeletal muscle troponin I (sTnI) や myosin light chain 3 (Myl3) がヒトやラットの骨格筋疾患/障害のバイオマーカーとして有用であることが報告された。しかしながら、消失が早いことや腎不全時にも血中で変化することなどの課題も報告されている。従って、骨格筋障害に特異的かつ高感度で、非臨床試験で利用可能なバイオマーカーの同定が求められている。骨格筋に豊富に発現している miR-206 は、骨格筋細胞の増殖や分化に重要な役割を有していることが知られており、またヒトでは筋疾患のバイオマーカーとなり得ることが報告されている。そこで、本研究では、血中 miR-206 が非臨床試験において特異的かつ高感度に骨格筋障害を検出できるバイオマーカーとなるか明らかにすることを目的として検討を行った。骨格筋障害を引き起こすことが知られている 2,3,5,6-テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン (TMPD) をラットに 4 mg/kg、1 日 2 回 3 日間、皮下投与することで、骨格筋障害モデルラットを作成した。5 回目の投与から 3 時間後と最終投与から 16 時間後に血清および血漿を採材し、CK、LDH、sTnI および Myl3 を測定した。また、血清より RNA を抽出し、real time PCR により miR-206 を測定した。その結果、TMPD の 5 回目の投与から 3 時間後において、全てのパラメーターは対照群と比べて TMPD 群で有意に高い値もしくはその傾向を示した (Fig. 2) 。特に、CK、LDH および miR-206 においては、壊死の程度が強い個体で高い値を示す傾向が認められた。最終投与から 16 時間後において、CK、LDH および sTnI では、TMPD 群は対照群と同程度の値を示したのに対し、miR-206 および Myl3 は TMPD 群の一例で高い値を示した。これらの結果から、miR-206 を用いることで既存マーカーと同程度以上の感度で骨格筋障害を検出できる可能性が示された。これに加え、過去社内試験において、骨格筋障害が認められた社内 4 化合物 (compound A – D) を投与し

たラットの血清サンプルを用いた評価を行った。Compound A – C 投与群において、CK、LDH、sTnI および Myl3 は対照群と同程度の値を示したのに対し、血中 miR-206 は増加傾向を示した (Fig. 3)。次に、Compound D 投与群においては、CK および LDH は対照群と比較し有意に高い値を示したものの、壊死が認められなかった個体でも高値を示した (Fig. 4A, B)。一方、miR-206、sTnI および Myl3 においては、壊死が認められた個体においてのみ高値を示す傾向が認められた (Fig. 4C – E)。次に、バイオマーカーとしての有用性を評価するため、TMPD もしくは compounds A - D を投与したラット 38 検体のうち、骨格筋壊死を示さなかった 20 検体分の結果を陰性、骨格筋壊死を示した 18 検体分の結果を陽性として用いて ROC (Receiver operator characteristic) 解析を行い、CK、LDH、miR-206、sTnI および Myl3 の感度および特異度を算出した。その結果、各パラメーターの感度および特異度はそれぞれ、CK は 83 %および 45 %、LDH は 72 %および 45 %、miR-206 は 56 %および 100 %、sTnI は 89 %および 75 %、Myl3 は 78 %および 85 %であった。従って、血中 miR-206 は他のパラメーターよりも骨格筋障害を検出する感度は劣るものの、高い特異性を有することが明らかとなった。次に、miR-206 の骨格筋障害に対する特異性を精査するため、心臓に特異性に障害を引き起こすイソプロテレノールを投与して心筋壊死を引き起こしたラットを用いて検討を行った。イソプロテレ

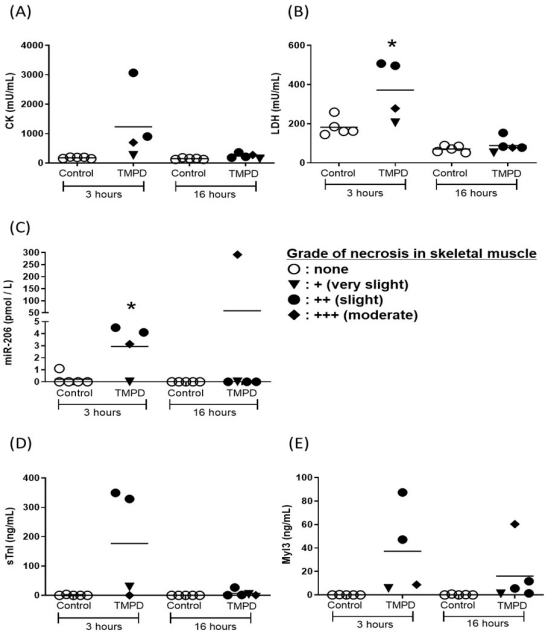


Fig. 2. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in TMPD-treated rats. Blood samples 3 hours after the 5th administration and 16 hours after the last (6th) administration were used. ○, no necrosis in the skeletal muscle; ▼, + (very slight); ●, ++ (slight) and ♦, +++ (moderate) of necrosis of skeletal muscle. *: $p < 0.05$ as compared with control group

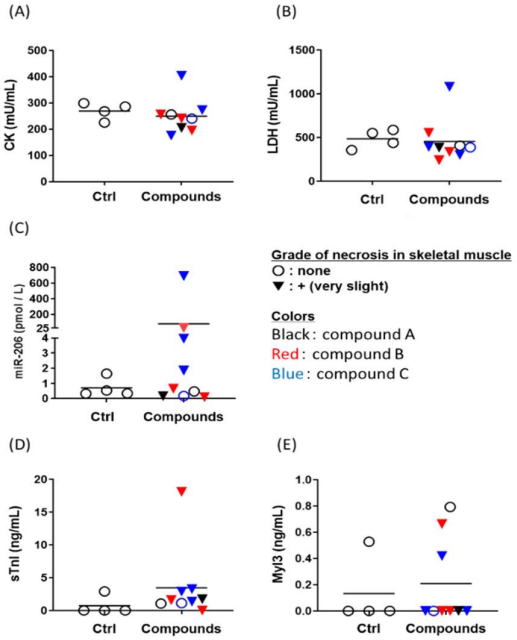


Fig. 3. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in compound A, B and C-treated rats. Blood samples 24 hours after administration were used. ○, no necrosis in the skeletal muscle; ▼, + (very slight) of necrosis of skeletal muscle. Black, red and blue colors represent rats treated with compound A, B and C, respectively.

ノール投与群では、Myl3 は対照群と比較して有意に血中で増加が認められたのに対し miR-206 は変化しなかった。従って、血中 miR-206 は骨格筋障害特異的に増加することが明らかになった。骨格筋に発現している CK や LDH は頻回採血により血中での値が増加することが確認されていることから、頻回採血が miR-206 発現量に与える影響を評価した。溶媒投与後 0.5、1、2、4、8、24 時間後の血中 miR-206 は最初の採血時と比較して 2 - 5 倍程度の増加を示したが、骨格筋障害時の約 100 倍程度の変化と比べて程度が低いことから、血中 miR-206 は頻回採血の影響を受けにくいことが明らかとなった。

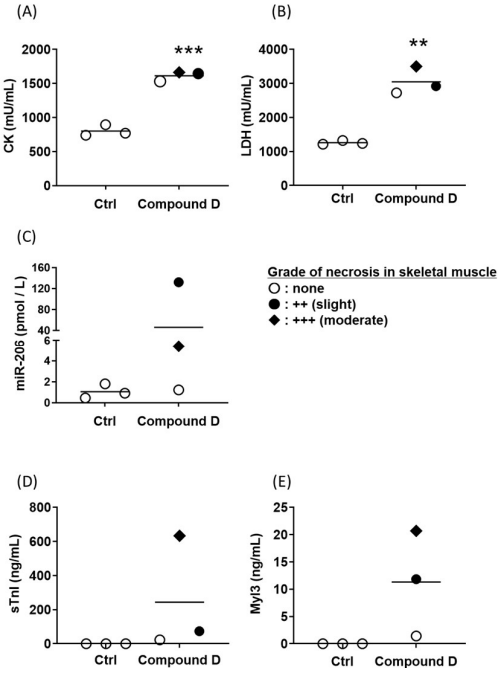


Fig. 4. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in compound D-treated rats. Skeletal muscle necrosis grades: ○, none; ●, 2+ (slight), +++ (moderate). Blood samples were taken 24 hours after the final treatment. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with the time-matched control group.

以上、本研究では、ヒトにおいて血中 miRNA の発現変動が様々な肝障害を分類できるバイオマーカーとなり得ること、また、血中 miR-206 はラットを用いた非臨床試験で骨格筋障害特異的なバイオマーカーとなり得る可能性を示した。

審査結果の要旨

血中 microRNAs (miRNAs) は疾患バイオマーカーとしての可能性が期待されている。本研究は、血中 miRNAs が異なる病型の肝障害を分類できる精度のよいバイオマーカーとなり得るか、また医薬品開発における非臨床毒性試験において薬剤性骨格筋障害を感度良く検出できるバイオマーカーとなるか検討したものである。

B 型肝炎、C 型肝炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎および薬物性肝障害に罹患した患者 28 名および肝機能に異常が認められないヒト (対照群) 4 名の血清を用いて、TaqMan microRNA array により 664 種類の miRNA を対象に網羅的な発現解析を行った。対照群および各肝障害群のいずれかの群間で発現量に有意差が認められたのは 37 miRNAs であり、主成分分析を用いることで、これら miRNA のプロファイルが各種の肝障害を分類可能であることを示した。骨格筋障害の検討では、骨格筋障害のモデル動物作製に頻用されている 2,3,5,6-テトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD) もしくは開発候補 4 化合物の投与により骨格筋障害を引き起こしたラットの血清を用い、骨格筋に特異的に発現する miR-206 を測定し、骨格筋障害の既存マーカーである creatine kinase (CK)、lactate dehydrogenase (LDH)、skeletal muscle troponin I (sTnI) および myosin light chain 3 (Myl3) との比較を行った。本検討により、miR-206 は骨格筋障害時に血中で増加し、さらに receiver operator characteristic (ROC) 解析から他の既存血中パラメーターよりも骨格筋に対する特異性が高いことを示した。また、心筋壊死を引き起こしたラットでは血中 miR-206 は増加しなかったことから、骨格筋特異的に変動するバイオマーカーとなる可能性を示した。

以上、従来のマーカーでは分類や検出が困難であった臨床における肝障害および非臨床における骨格筋障害について、血中 miRNA はバイオマーカーとなりうる可能性を示した点で創薬科学的意義が認められることから、博士（創薬科学）論文に値すると判定された。