

博 士 論 文

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

2020

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 (博士後期課程) 創薬科学専攻
薬物代謝安全性学研究室

学籍番号

1429012019

学生氏名

山浦 優

主任指導教官

中島 美紀

論文提出

令和2年7月

目次

略語表

序論		1
第 I 章	miRNA のバイオマーカーとしての役割	4
第 II 章	肝障害患者における血清中 miRNA の網羅的発現変動解析	7
第 1 節	緒言	7
第 2 節	実験材料および実験方法	7
II-2-1	実験材料および試薬	7
II-2-2	肝障害患者の血清	7
II-2-3	<i>mirVana</i> PARIS Kit を用いた血漿からの RNA の抽出	9
II-2-4	RT 反応による cDNA の合成	9
II-2-5	PreAmp 反応による cDNA の増幅	10
II-2-6	TaqMan microRNA array 解析	10
II-2-7	主成分分析	10
II-2-8	統計解析	11
第 3 節	実験結果	11
II-3-1	肝障害患者血清中 miRNA の網羅的発現プロファイル解析	11
II-3-2	主成分分析による肝障害患者血清中 miRNA の網羅的発現 量解析	14
第 4 節	考察	17
第 III 章	薬剤性骨格筋障害モデルラットにおける miR-206 の有用性検討	20
第 1 節	緒言	20

第 2 節	実験材料および実験方法	20
III-2-1	実験材料および試薬	20
III-2-2	化合物の投与と採血および組織採取	21
III-2-3	血漿中および血清中マーカー値の測定	22
III-2-4	病理組織学的検査	22
III-2-5	血清からの RNA の抽出および miR-206 発現量の測定	22
III-2-6	頻回採血が血清中 miR-206 および Myl3 値に与える影響	23
III-2-7	統計解析	24
第 3 節	実験結果	24
III-3-1	骨格筋障害モデルラットの評価	24
III-3-2	骨格筋障害モデルラットにおける血漿中 CK、LDH と血清 中 miR-206、sTnI および Myl3 の変化	25
III-3-3	CK、LDH、miR-206、sTnI および Myl3 の骨格筋障害バイ オマーカーとしての感度と特異度	29
III-3-4	頻回採血が血中 miR-206 発現量に与える影響	31
第 4 節	考察	32
	総括	35
	参考文献	37
	謝辞	44
	参考論文	45

略語表

本論においては以下の略語を用いた。

Ago2	argonaute 2
AIH	autoimmune hepatitis
ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine transaminase
ANOVA	analysis of variance
AST	aspartate transaminase
AUC	area under the curve
Bcl2	b-cell lymphoma 2
CK	creatine kinase
Ct	cycle threshold
Ctrl	control
DILI	drug-induced liver injury
HB	hepatitis B
HC	hepatitis C
HDL	high-density lipoprotein
LDH	lactate dehydrogenase
MC	methyl cellulose
miRNAs	microRNAs
Myl3	myosin light chain 3
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
PBC	primary biliary cirrhosis
PC	principal component
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
ROC	receiver operator characteristic

sTnI	skeletal troponin I
T-Bil	total bilirubin
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
TMPD	2,3,5,6-tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
TNF	tumor necrosis factor

序論

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。1993 年に線虫で最初の miRNA が発見され (Lee et al., 1993)、これまでヒトで 2,600 種類、マウスで 1,900 種類、ラットで 700 種類以上の miRNAs が同定されている (miRBase version 22)。miRNAs は同定された順に miR の後ろに番号が付けられており (Ambros et al., 2003; Griffiths-Jones., 2004)、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 (Ambros, 2001) 機能を有しており、発生や分化などの多彩な生命現象に関与すること、その発現異常が癌をはじめとするさまざまな疾患に関与すること (Johnson et al., 2005) が明らかになっている。

RNA 分解酵素が豊富に存在する血中に、miRNAs が安定的に存在していることが 2008 年に報告された (Mitchell et al., 2008)。血中に存在する miRNAs は microvesicle と呼ばれる膜成分に内包されているため (Valadi et al., 2007; Mitchell et al., 2008)、もしくは argonaute 2 (Ago2) や high-density lipoprotein (HDL) などのタンパク質と複合体を形成しているため (Arroyo et al., 2011; Vickers et al., 2011) に RNA 分解酵素に耐性を示すと考えられている。血中 miRNAs の存在が判明して以降、血中 miRNAs が癌 (Mitchell et al., 2008) や糖尿病 (Chen et al., 2008) をはじめ、様々な疾患のバイオマーカーとなる可能性が注目されている。本研究では、臨床において既存の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、および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ついて、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 (hepatocellular injury type)、胆汁うっ滞型 (cholestasis type) および混合型 (mixed type) に分類される。また、高脂肪食やアルコール摂取による肝障害は肝炎 (hepatitis) または脂肪肝 (steatosis) や脂肪性肝炎 (steatohepatitis) から肝線維症 (fibrosis)、肝硬変 (cirrhosis) および肝癌

(hepatoma) 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。肝細胞障害型では ALT および AST の上昇が、胆汁うっ滞型では ALP および T-Bil の上昇が認められる。しかし、ALT は飲酒や運動により一過性に上昇することや、AST は心筋および骨格筋にも存在し、心疾患などによっても上昇することが知られており (Nathwani et al., 2005; Antoine et al., 2009)、肝障害を特異的に検出しているとはいいきれない。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。一方、ウイルス性肝炎の診断には、ウイルス抗原や抗体を測定するなどのさらなる検査が必要となる。薬物性やアルコール性肝障害の診断においては、医薬品の服用やアルコール摂取の聴取など患者の自己申告に頼るため、診断を誤る場合がある。血中マーカーで原因や病型が特定されない場合、肝生検が行われることもある。肝生検は肝組織を直接観察するため最も確実な検査法とされ、肝障害の程度の判定、原因不明の肝障害の診断および黄疸の原因究明が可能である。しかし、食事制限や麻酔を要するなど患者への負担が大きい。そのため、様々な肝障害を分類できる低侵襲性の血中マーカーの開発が急務である。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た (Yamaura et al., 2012)。さらに、肝臓に特異的かつ豊富に発現している miR-122 の経時的発現変動解析および肝細胞壊死の程度との比較から、血中 miRNA のバイオマーカーとしての有用性を示した (Yamaura et al., 2012)。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できるか、様々な病型の肝障害患者の血清中 miRNA の発現プロファイルを評価した。

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 (Olson et al., 2000)、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。例えば、セリバスタチンは重篤な横紋筋融解症に起因する死亡例が多数報告されたことから、2001 年に販売中止となった (Kalaria and Wassenaar, 2002)。現在、臨床で筋疾患のバイ

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、非臨床毒性試験においても骨格筋障害の検出に頻用されている (Grindem et al., 2017)。しかし、CK や LDH は心筋や脳、肝臓などでも発現が認められており、これらの臓器障害の際にも血中で増加することが知られている (Grindem et al., 2017)。さらに、CK や LDH は運動 (Sastre et al., 1992) や加齢、筋肉量、妊娠、飲酒 (Matsuzaka et al., 2014) によって変動することが報告されており、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、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 (Simpson et al., 2005; Matziolis et al., 2011; Burch et al., 2016)。しかしながら、消失の早さや腎不全時に血中で変化するという課題も報告されている (Tonomura et al., 2012)。従って、骨格筋障害に特異的かつ高感度で、非臨床毒性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 (Minami et al., 2014)、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 (Chen et al., 2010; Dey et al., 2011; Ma et al., 2015)、また血中 miR-206 が臨床で筋ジストロフィー (Hu et al., 2014) や骨格筋萎縮 (Wang et al., 2017)、筋萎縮性側索硬化症 (Toivonen et al., 2014) といった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。加えて、筋毒性を誘発するタイガースネーク由来毒素であるノテキシンをラットに投与した際、血漿中の miR-206 が上昇することが報告されている (Siracusa et al., 2016)。しかしながら、血中 miR-206 が医薬品開発における非臨床毒性試験で薬剤性骨格筋障害の検出に利用可能かどうかは明らかになっていない。そこで本研究では、血中 miR-206 が薬剤性骨格筋障害のバイオマーカーとなるか、モデルラットを構築して血中 miR-206 および既存の骨格筋に発現するパラメーターを測定し、評価を行った。

第 I 章 miRNA のバイオマーカーとしての役割

ヒト全 miRNA のうちの約 10%程度が組織もしくは細胞特異的に発現していることが知られている (Ludwig et al., 2016)。miRNA の発現は炎症、低酸素状態、また薬剤処置といった外因性刺激によって変動すること、また老化や心疾患、がんなどの疾患の過程によっても変動し、発症・進行に寄与していることが報告されている (Bracken et al., 2016; Lin et al., 2016; Zhu et al., 2017; Kreth et al., 2018)。例えば、乳癌の発症・進行に miR-27b による CYP1B1 の発現制御が関与している可能性が報告されている (Tsuchiya et al., 2006)。CYP1B1 はシトクロム P450 分子種であり、エストロゲンを DNA 損傷性の代謝物に変換することから発癌に関与していることが知られている。Tsuchiya らの報告では、乳癌組織において非癌部と比べて miR-27b の発現量が低いことが癌組織で CYP1B1 タンパク質が高発現する原因であることが示されている。さらに癌組織で発現が増加する miR-21 も癌遺伝子としての役割を担っており、癌の発症や進行に寄与することが知られている (Toiyama et al., 2013; Feng and Tsao, 2016)。また、疾患の発症や進行に様々な miRNA が複雑に関与しているケースもあり、その例として肝臓の線維化が挙げられる。肝臓の線維化は細胞外マトリックスが無秩序に増加することで発症・進行していくが、肝での細胞外マトリックス産生には肝星細胞が重要な働きをしていることが知られている (村脇, 川崎, 1999)。さらに星細胞の増殖、活性化、マトリックス産生能に各種のサイトカインが関与しているが、中でも transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) は最も強力な線維化促進性サイトカインである (Massague, 1990; Border and Noble, 1994)。miR-194、miR-29、miR-150 は肝星細胞の活性化に寄与し、また miR-192 や miR-133a は TGF- β 1 を制御することが知られている (Roderburg et al., 2013; Sanjay and Girish, 2017)。このように、様々な miRNA が複雑に線維化関連の遺伝子やパスウェイを制御することで、発症や進行に関与していると報告されている。

2008年にmiRNAsが血中に存在しており、そのうちmiR-141が前立腺がん患者において有意に高い値を示すことが報告された (Mitchell et al., 2008)。この報告以降、がん (Cermelli et al., 2011; Ding et al., 2012) に加え、肝障害 (Starkey et al., 2011; Roderburg et

al., 2011)、心不全 (Devaux et al., 2017) など様々な疾患において、血中miRNAsがバイオマーカーとなる可能性が報告されている。このうち、肝障害に関しては臨床検体を用いた検討に加え、非臨床検体を用いた検討 (マウス : Wang et al., 2009、ラット : Laterza et al., 2009; Yamaura et al., 2012; 、カニクイザル : Iguchi et al., 2018、イヌ : Oosthuyzen et al., 2018; Eman et al., 2018) も多くなされており、種を超えて肝障害時に血中miRNAが変動することが分かっていることから、医薬品開発における非臨床試験でもバイオマーカーとして利用できる可能性が示されている。

ある疾患で血中でのmiRNAの発現が増加する主なメカニズムとして、細胞障害による漏出型と、細胞での発現が増加し血中にも反映される分泌型の2種類がある。漏出型は、ALTなどの逸脱酵素と同様に細胞膜の損傷に伴う細胞内成分の漏出により、血中で発現が増加すると考えられており、例えば肝臓に特異的かつ豊富に発現しており肝障害により血中での発現が増加するmiR-122がある (Wang et al., 2009)。一方、分泌型では、癌などの疾患によって細胞内での発現が増加したmiRNAが、エンドサイトーシスにより血中に分泌されることにより、血中で発現が増加すると考えられており、例としてmiR-21がある (Toiyama et al., 2013)。分泌型メカニズムにより血中での発現が増加するmiRNAsに関しては、疾患との関連も十分に評価されている点を踏まえても、バイオマーカーとしての有用性は高いと考えられる。

miRNAをバイオマーカーとして用いる利点として、罹患しているか否かの診断にとどまらず、疾患の程度や進行度に関しても評価できる可能性が報告されている。例として、従来の腫瘍マーカーでは即時の治療が必要な悪性度の高い腫瘍であるか、その必要はないものかを判断することは非常に困難であった。Mihelich ら (2015) は前立腺癌患者の血清より miRNA を採取して解析し、14 種類の miRNA の発現パターンが、悪性度の高い腫瘍の患者と悪性度が比較的低い腫瘍の患者では異なることを見出した。この結果を利用することにより、即時の治療が必要のない患者に対する過剰な治療を防ぐことができる可能性がある。また前立腺癌については、骨へ転移するケースが多く認められるが、骨転移は患者の生存率と密接な関係が知られており、骨転移の判定は非常に重要である。これに関し、miR-15、miR-16およびmiR-21の血中発現量と前立腺癌の骨への転移の頻度が、高い相関性を示すことが報告されている (Bonci et

al., 2016)。このように、血中miRNAを用いることで疾患の診断に加え、疾患の程度や進行度に関しても評価できる可能性があることから、多くの大学・企業で研究が行われてきた。近年の日本における取り組みとしては、2014年より産官学によるNEDO研究開発プロジェクト「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発」が開始され、臨床検体を用いた大規模なmiRNAの癌診断バイオマーカーとしての検証実験が行われている。当プロジェクトにおいては、臨床現場における血清中のmiRNAの抽出から検出までを全自動で、簡便かつ短時間に行えるような自動検査システムの開発も行われており、臨床現場での実用化が現実的になりつつある。

以上、血中miRNAは様々な疾患でバイオマーカーとしての有用性に関する報告が多数なされており、今後、臨床や非臨床での実用化が期待されている。このような背景のもと、本研究では血中miRNAが臨床現場における肝障害バイオマーカーおよび非臨床毒性試験における薬剤性骨格筋障害バイオマーカーとなるか評価を行った。

第 II 章 肝障害患者における血清中miRNAの網羅的発現変動解析

第 1 節 緒言

本章では、様々な肝障害患者において血中 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明らかにすることを目的とし、肝障害患者の血中 miRNA 発現変動解析を行った。B 型肝炎 (Hepatitis B, HB)、C 型肝炎 (Hepatitis C, HC)、自己免疫性肝炎 (Autoimmune hepatitis, AIH)、原発性胆汁性肝硬変 (Primary biliary cirrhosis, PBC)、NASH、薬物性肝障害 (Drug-induced liver injury, DILI) 患者および対照群として肝臓に異常が認められないヒトの血清から RNA を抽出して TaqMan microRNA array 解析を行った。

第 2 節 実験材料および実験方法

II-2-1 実験材料および試薬

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、*mirVana* PARIS Kit、2× TaqMan Universal Master Mix NoAmp Erase UNG、Megaplex Primer Pools Human Pools、TaqMan Human MicroRNA Array v2.0 は Applied Biosystems (Foster City, CA) より購入した。RNAiso Plus および Dr. GenTLE Precipitation Carrier はタカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または一級のものを用了。以下に本章で使用した試薬の組成を示した。

II-2-2 肝障害患者の血清

Table 1. Clinical data of patients with liver injury or control.

Group	No.	Age	Gender	ALT	ALP
HB	1	60	M	43	317
	2	57	F	181	259
	3	59	M	61	222
	4	34	F	26	27
	5	54	M	27	192
	6	59	F	18	239
HC	1	52	M	47	251
	2	66	F	146	233
	3	50	F	52	230
	4	61	M	27	31
PBC	1	40	F	114	481
	2	54	F	66	837
	3	54	F	33	364
AIH	1	46	F	323	382
	2	67	F	22	260
	3	54	F	83	286
NASH	1	47	M	183	455
	2	52	M	110	129
	3	53	M	33	251
	4	41	F	218	138
	5	28	F	123	214
DILI	1	53	M	175	1473
	2	43	M	212	736
	3	69	M	1141	528
	4	70	M	843	661
	5	45	F	236	359
	6	50	M	684	487
	7	65	F	722	222
Ctrl	1	68	F	22	231
	2	68	F	18	348
	3	58	M	11	182
	4	52	M	15	171

HB: Hepatitis B, HC: Hepatitis C, AIH: Autoimmune hepatitis, PBC: Primary biliary cirrhosis, NASH: Non-alcoholic steatohepatitis, DILI: Drug-induced liver injury, Ctrl: Control.

肝障害患者の血清は、富山大学医学部第三内科 田尻 和人博士、峯村 正実博士 (現富山大学附属病院 地域医療総合支援学講座 客員教授) よりご供与頂いた。肝障害の分類、年齢、性別、血中マーカー値および既往症を Table 1 に示す。対照群として、肝臓に異常が認められないヒト (control と記す) の血清サンプルも得た。

II-2-3 *mir*Vana PARIS Kit を用いた血漿からの RNA の抽出

TaqMan microRNA array 解析に用いる RNA は *mir*Vana PARIS Kit により抽出した。血清 600 μ L に 2 \times Denaturing Solution を 600 μ L 加えて転倒攪拌し、5 分間氷冷した。1.2 mL の Acid-Phenol:Chloroform を加えて 5 分間攪拌し、12,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を回収し、同様に Acid-Phenol:Chloroform を加えて抽出の操作を行った。上清を回収して 1.25 倍容の 100%エタノールを加え、転倒攪拌した。Collection Tube に Filter Cartridge をのせてサンプルをアプライし、12,000 rpm で 30 秒間遠心分離した。ろ液を捨て、miRNA Wash Solution 1 を 700 μ L アプライし、12,000 rpm で 15 秒間遠心分離した。ろ液を捨て、Wash Solution 2/3 を 500 μ L アプライし、12,000 rpm で 15 秒間遠心分離した。ろ液を捨て、再度 Wash Solution 2/3 で洗浄し、さらに 12,000 rpm で 1 分間遠心分離した。Filter Cartridge を新しい Collection Tube に移し、95 $^{\circ}$ C に加温した Nuclease-free water 100 μ L を加え、12,000 rpm で 30 秒間遠心分離した。

II-2-4 RT 反応による cDNA の合成

II-2-3 で抽出した RNA 溶液 3 μ L に Nuclease-free water 0.2 μ L、25 mM MgCl₂ 0.9 μ L、10 \times RT Buffer 0.8 μ L、10 \times MegaplexTM RT primers 0.8 μ L、100 mM dNTPs (with dTTP) 0.2 μ L、20 U/ μ L RNase Inhibitor 0.1 μ L、50 U/ μ L Multi ScribeTM RT 1.5 μ L を加え、全量を 7.5 μ L とし、5 分間氷冷した。16 $^{\circ}$ C で 2 分、42 $^{\circ}$ C で 1 分、50 $^{\circ}$ C で 1 秒の反応を 40 サイクル行った後、85 $^{\circ}$ C で 5 分間処理することで酵素を失活させた。

II-2-5 PreAmp 反応による cDNA の増幅

I-2-4 で得た cDNA 溶液 2.5 μ L に Nuclease-free water 7.5 μ L、10 \times Megaplex PreAmp Primers 2.5 μ L、2 \times TaqMan PreAmp Master Mix 12.5 μ L を加え、全量を 25 μ L とし、5 分間氷冷した。95 $^{\circ}$ C で 10 分、55 $^{\circ}$ C で 2 分、72 $^{\circ}$ C で 2 分反応させ、さらに 95 $^{\circ}$ C で 15 秒、60 $^{\circ}$ C で 4 分の反応を 12 サイクル行った後、99.9 $^{\circ}$ C で 10 分間処理することで酵素を失活させた。

II-2-6 TaqMan microRNA array 解析

TaqMan Human MicroRNA Array を用いて、7900HT Fast real-time PCR System (Applied Biosystems) にてアレイ解析を行った。TaqMan Human MicroRNA Array は 2 つのサブセット (A と B) で構成されており、計 664 のプローブが搭載されている。I-2-5 で得た PreAmp 産物 9 μ L に 2 \times TaqMan Universal Master Mix NoAmp Erase UNG 450 μ L と Nuclease-free water 441 μ L を加えて転倒攪拌した。TaqMan microRNA array のポートに 100 μ L ずつ注入し、1,200 rpm で 1 分間の遠心を 2 回行った後、シールした。50 $^{\circ}$ C で 2 分、95 $^{\circ}$ C で 10 分反応させた後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒、60 $^{\circ}$ C で 1 分の反応を 40 サイクル行った。

II-2-7 主成分分析

本検討においては、(40-Ct) 値を解析に用い、この値が高いと発現レベルが高いことが判断しやすいようにした。まず、1 つ以上の検体において 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 miRNA を絞り込んだ。なお、40-Ct 値が 8 以下の miRNA に関しては、非特異的な増幅を検出している可能性があるため、40-Ct 値を 0 とし、以降の評価を実施した。絞り込んだ miRNAs のうち、ANOVA 解析からいずれかの群において有意な変化 ($P < 0.05$) があると判断された 37 miRNAs を用いて Partek Genomics Suite version 6.12 (Partek, St. Louis, MO) により主成分分析を実施し

た。

II-2-8 統計解析

Graphpad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用い、血中で検出された miRNA 数の対照群と肝障害群での比較解析には Student's *t*-test を、miRNA の発現量の各群間での比較解析には Tukey's Multiple Comparison Test を用いた。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意とした。

第3節 実験結果

II-3-1 肝障害患者血清中 miRNA の網羅的発現プロファイル解析

32 名の肝障害患者および 4 名の対照群の血清を用いて、miRNA の網羅的発現プロファイル解析を行った。(40-Ct) 値がカットオフ値である 8 以上で増幅された miRNA の数を Table 2 に示す。検出された miRNA の数は個人で異なることが明らかとなった。また、対照群と比べて肝障害患者で検出される miRNA の数が多いという傾向は認められなかった。

全 32 検体のうち、1 つ以上の検体において 40-Ct 値がメーカー推奨のカットオフ値である 8 以上の値を示したのは、201 miRNAs であった。これら 201 miRNAs のうち、対照群および各肝障害群のいずれかの群間で、これらの miRNA の発現量に有意差が認められたのは 37 miRNAs であった (Fig. 1)。

37 miRNAs のうち、miR-218、miR-363、miR-518f、miR-628-5p、miR-888、miR-523、miR-141、miR-302b および miR-643 は対照群でのみで検出され、どのタイプの肝障害群でも検出されなかった。miR-29a は対照群と比較して全肝障害群で有意に低い値を示し、さらに AIH 群では DILI 群と比較して有意に低い値を示した。miR-573 は対照群と比較して DILI 群で有意に低い値を示し、PBC および AIH 群では検出されなかった。

Table 2. Number of miRNAs whose levels were over the cut off value.

Groups	No.	Number of miRNA
		(40-Ct)>8
HB	1	127
	2	111
	3	91
	4	63
	5	97
	6	85
HC	1	76
	2	89
	3	67
	4	37
PBC	1	78
	2	71
	3	74
AIH	1	105
	2	100
	3	86
NASH	1	60
	2	98
	3	101
	4	130
	5	121
DILI	1	95
	2	111
	3	135
	4	127
	5	112
	6	87
	7	87
Ctrl	1	55
	2	65
	3	91
	4	101

対照群と比較して、肝障害群で高い値を示した miRNAs は以下の通りである。
miR-378 と let-7b は対照群で検出されなかったのに対し、全肝障害群で検出された。
miR-122 と miR-192 は対照群と比較して全肝障害群で有意に高値を示した。
miR-574-3p は、対照群と比較して DILI 群で高い値で検出されたが、HC、PBC および AIH 群で検出されなかった。miR-193a-5p と miR-148a も対照群、HC および AIH 群では検出されなかったのに対し、DILI 群では高い値で検出された。miR-520d-5p は DILI 群のみで検出された。miR-16 および miR-222 は対照群および HC 群と比較して DILI 群で有意に高い値を示した。miR-320 は対照群および HB 群と比較して DILI 群で有意に高い値を示した。miR-345 および miR-193b は対照群、AIH では検出されなかったものの、HB、NASH および DILI 群で高い値を示した。miR-483-5p は対照群と比較して、HB、NASH および DILI 群で有意に高い値を示した。

次に対照群と肝障害群の間に差はないものの、各肝障害群の間で miRNA 発現量に有意な差が認められた miRNAs は以下の通りである。miR-21、miR-20a、miR-92a および miR-375 は HC 群では検出されなかったのに対し、DILI 群で高い値で検出された。miR-423-5p は DILI および PBC 群でのみ検出された。miR-374a は DILI および HB 群と比較して HC 群で有意に低い値を示した。miR-19a、miR-19b および miR-26b は DILI、HB および NASH 群と比較して HC 群で有意に低い値を示した。miR-142-3p、miR-25 および miR-451 は DILI、HB、PBC および NASH 群と比較して HC 群で有意に低い値を示した。以上の結果から、37 miRNAsの中には、各肝障害群間で有意な差が認められた miRNAs は存在するものの、一部の miRNAs は他の肝障害群においても類似した値を示し、肝障害の種類を分類するバイオマーカーとして単独の miRNA を利用するのは困難と考えられた。

II-3-2 主成分分析による肝障害患者血清中 miRNA の網羅的発現量解析

次に、主成分分析により肝障害患者血清中 miRNA の発現プロファイルを解析した。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がある場合、これら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。合成変数は、できるだけ

け多く元の変数の情報量を含むようにするため、データの散らばり具合、つまり分散をもとに作成される。分散が最大の方に軸をとり、その軸における変数を第一主成分 (principal component 1, PC1) と呼ぶ。しかし、PC1 のみでは元の変数の情報を全て含むことは不可能なため、次に分散が大きい方向に軸をとり、その軸における変数を第二、第三成分と作成していく。また、各成分が全成分のどの程度の割合を説明できるか示した値が寄与率として算出される。

対照群および各肝障害群のいずれかの群間で miRNA の発現量に有意差が認められた 37 miRNAs の発現量について主成分分析を行ったところ、PC1 では全体の 43.9% の寄与率を示し、PC2 は 22.6%、PC3 は 6.99%、PC4 は 5.43% を示した。各検体の PC1、2 および 3 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. 2A)。従って、肝障害患者と健常人を PC1、2 および 3 の成分を用いたプロットにより、分類できることが明らかとなった。しかしながら、肝障害群のうち、HB、PBC、NASH および DILI 群は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 を軸にプロットしたところ、HB と NASH 群は比較的近くにプロットされたものの、他の肝障害群に関しては離れた位置にプロットされた (Fig. 2B)。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、対照群と肝障害群では血中 miRNA 発現プロファイルが大きく異なり、さらに肝障害の病型および病因によっても発現プロファイルに違いがあることが明らかとなった。従って、これら 37 種類の miRNA の血清中発現パターンは、肝障害の病型および病因を特定可能なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

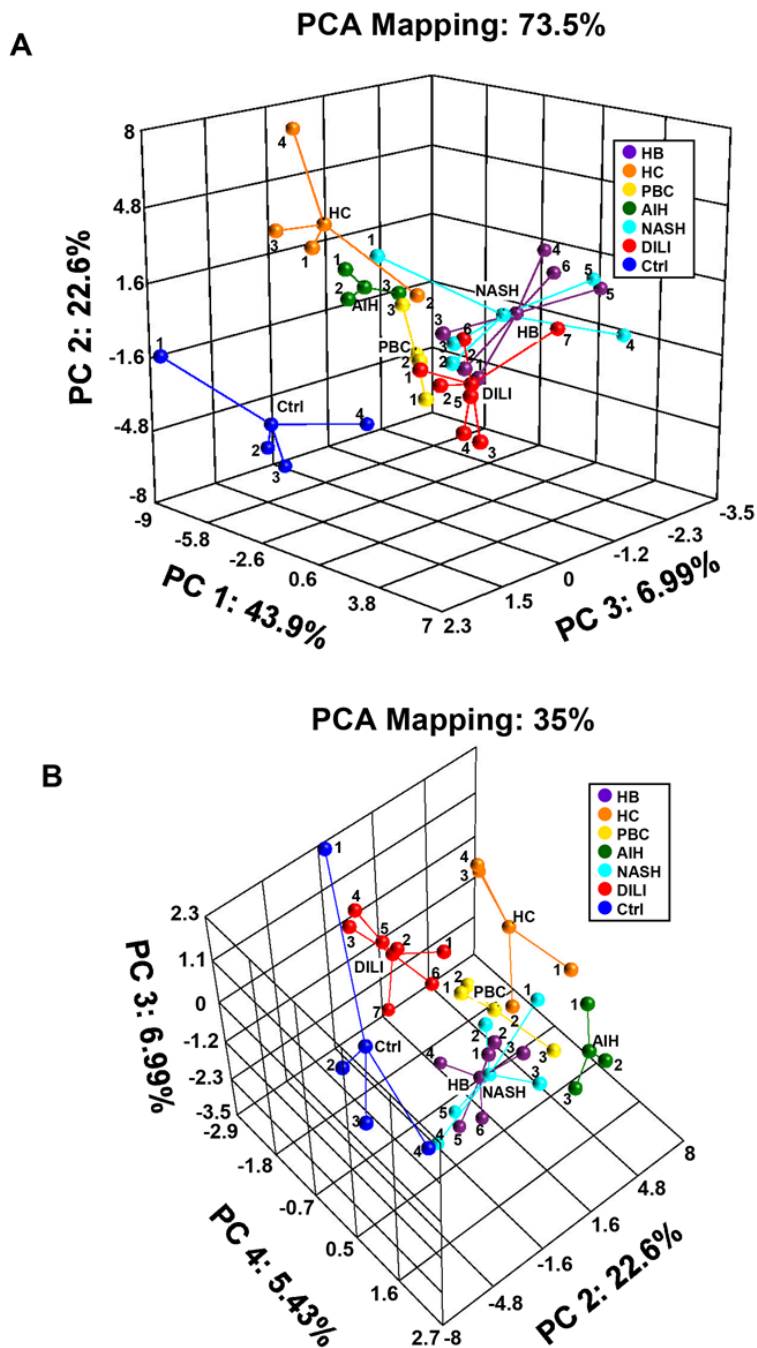


Fig. 2. PCA of serum miRNA expression in 6 hepatitis B (HB), 4 hepatitis C (HC), 3 primary biliary cirrhosis (PBC), 3 autoimmune hepatitis (AIH), 5 non-alcoholic steatohepatitis (NASH), 7 drug-induced liver injury (DILI), and 4 control (Ctrl). PCA was performed using 37 miRNAs that exceeded the cut off 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.

第4節 考察

肝障害と言っても多種多様な病態が存在する中で、近年、ある一種類の肝障害患者と健常人での血中 miRNA の変化を比較している論文が散見される (Starkey et al., 2011; Roderburg et al., 2011)。このような評価の場合、報告された miRNA が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は不明である。この問題を解決するため、本研究では HB、HC、AIH、PBC、NASH、DILI 患者および対照群の血清中 miRNA の網羅的な発現プロファイリング解析を行った。

Noren ら (2010) は miRNA の発現プロファイルが加齢により変化することを報告しているため、対照群は患者群と同程度の年齢の検体を用いた。加えて、血清や血漿におけるいくつかの miRNA の発現量には性差が認められるとの報告もある (Duttgupta et al., 2011; Wang et al., 2012)。本検討では、各群の検体数は miRNA の発現量の性差を評価するには十分ではないと判断し、性差は考慮せず、群間での miRNA の発現量の変化を評価した。

血中 miR-122 は HB (Cermelli et al., 2011) や HC (Ding et al., 2012)、NASH (Cermelli et al., 2011)、アルコール性肝障害 (Zhang et al., 2010)、DILI (Zhang et al., 2010; Starkey et al., 2011) や肝がん (Cermelli et al., 2011; Ding et al., 2012) などの多くの肝障害のバイオマーカーとして報告されている。本検討においても、miR-122 は HB、PBC、NASH、DILI において対照群よりも有意に高い値を示した。加えて、HC や AIH でも対照群と比較して高い値を示す傾向が認められ、過去の報告を支持するものであった。肝障害時の血中 miR-122 の増加は、肝臓特異的に発現する miR-122 が肝臓の障害で肝細胞から血中に漏出したためであると考えられる。従って、miR-122 は様々な肝障害を検出する有能なバイオマーカーであるとともに、肝障害の種類を分類することは困難であることを意味する。

対照群および各肝障害群のいずれかの群間で miRNA の発現量に有意差が認められた 37 miRNAs のうち、miR-218、miR-363、miR-518f、miR-628-5p、miR-888、miR-523、miR-141、miR-302b、miR-643 および miR-29a は対照群と比較して全ての肝障害群で有意に低い値を示した。これらの miRNA のうち、miR-218 はアセトアミノフェン誘

導性肝障害において、血清もしくは血漿中で発現量が増加することが示されているが、これはアセトアミノフェン誘発性脳障害に起因していると報告されている (Starkey et al., 2011)。理由として、miR-218 が脳に高く発現していること、また血中 miR-218 がアセトアミノフェン誘発性肝障害患者のうち、脳障害 (grade 4) を有する患者において脳障害が認められない (grade 0) 患者と比較して有意に高い値を示したことがあげられる。従って、miR-218 は他臓器障害で血中での発現量の変動することから、単独では肝障害のバイオマーカーに適していないと考えられる。本研究の結果では miR-218 を含む数種類の miRNA の減少が認められた。複数の miRNA を評価することで、他臓器障害による変動といったノイズを排除し、肝障害の診断を精度高く行える可能性が示唆された。アルコール性肝硬変などの肝線維化を有する患者において血中での miR-29a 発現が低下していると報告されている (Roderburg et al., 2011)。本検討では、miR-29a はすべての肝障害患者において低い値を示した。HB、HC、PBC、NASH は通常、肝線維化を伴っているものの、薬剤服用後、早期に発症する DILI では肝線維化は認められないことが多い。従って、miR-29a は肝線維化のバイオマーカーではなく、全般的な肝障害のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

miR-192発現量はDILI患者において血中で高値を示すことがStarkeyら (2011) によって報告されているが、本検討ではDILI以外にHB患者においても高値を示すことが明らかになった。また、Shwethaら (2013) は、miR-483-5p発現量がC型肝炎ウイルス感染により血中で高値を示すことを報告している。本検討においてmiR-483-5pはHC患者で高い値を示す傾向にあったものの、HB、DILI、NASH患者においても有意に高い値を示した。Shrivastavaら (2013) はmiR-20aとmiR-92a発現量が血中で高値を示すことから、これらのmiRNAsがC型肝炎ウイルス感染の早期バイオマーカーになると報告している。しかし、本検討では、HC患者におけるこれらの値は対照群と同程度であり、一方、DILI患者で高値を示すことが明らかになった。従って、miR-20aとmiR-92aはC型肝炎ウイルス感染のバイオマーカーとして利用できないと考えられた。

miRNA の細胞内における発現は、様々な疾患によって変化することが知られており (<http://www.miR2disease.org/>)、また miRNA による遺伝子の発現調節が疾患の発症や進行の原因となることが知られている (Kreth et al., 2018)。本検討において、対照群

と各肝障害群のいずれかの群間での発現量に有意差が認められた 37 miRNAs のうち、いくつかの miRNAs に関しては、肝障害の発症もしくは進行メカニズムへの関連が報告されている。例えば、miR-29 は肝線維化を促すコラーゲンの発現抑制 (Roderburg et al., 2011)、miR-21 はプログラム細胞死に関する遺伝子の発現抑制や抗炎症反応の促進 (Szabo and Bala, 2013)、miR-16 は抗アポトーシス遺伝子である Bcl2 (b-cell lymphoma 2) の発現抑制および TNF (tumor necrosis factor) 誘導性アポトーシスの促進 (Szabo and Bala, 2013) に関与すると報告されている。しかしながら、その他の miRNAs に関しては、肝障害への機能的関与は未だ解明されていない。本研究は肝障害を分類可能なバイオマーカーの確立に向けた研究であり、よりバイオマーカーとしての妥当性を説明するためには、今回抽出した 37 miRNAs の肝障害における機能を明らかにする必要があると考える。

異なる原因や病名の肝障害であっても病態が類似しているために、一つもしくは数種類の miRNA で肝障害の種類を分類することは困難であると考えられた。そこで、本研究では選定した miRNA に関して PCA 解析を行い、種々の肝障害を分類できないか検討を行った。Fig. 2 に示した通り、37 miRNAs のプロファイルは肝障害群と対照群で明確に区別されることが明らかになった。さらに、PCA において PC2、3 および 4 を軸に解析した結果、各肝障害群の変数がそれぞれ近くにプロットされたことから、37 miRNAs の血清中発現量によって肝障害を分類できる可能性が示された。これに加え、様々な種類の肝障害を一度に診断可能であるという点において、本研究で見出された 37 miRNAs は非常に有用なバイオマーカーになり得ると考えられた。

以上、本章ではヒトにおいて血中 miRNAs の発現プロファイルが肝障害病型によって異なることを明らかにした。今回見出した 37 種類の血中 miRNA の発現プロファイルを評価することで、ヒトの肝障害を診断および分類できるツールとして使用できる可能性が示唆された。

第 III 章 薬剤性骨格筋障害モデルラットにおける miR-206 の有用性検討

第 1 節 緒言

本章では血中 miR-206 が非臨床毒性試験において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、さらに既存のバイオマーカーと比較して、感度および特異性が優れた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、検討を実施した。まず、2,3,5,6-テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン (TMPD) 投与により薬剤性骨格筋障害モデルラットを作製した。薬物の投与後、大腿筋、下腿筋、横隔膜および頸多裂筋のヘマトキシリン・エオシン (hematoxyline eosin, HE) 染色を行い、骨格筋障害を評価した。既存のバイオマーカーである CK および LDH を血漿より、近年骨格筋障害のバイオマーカーとして注目されている sTnI および Myl3 を血清より測定した。また、血清より RNA を抽出し、real time PCR 法を用いて miR-206 を測定した。加えて、過去社内試験において、骨格筋障害が認められた compound A、B、C および 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。また、miR-206 の骨格筋障害に対する特異性を評価するため、イソプロテレノール投与による心筋壊死モデルラットを作成し、血清中 Myl3 および miR-206 の測定を行った。

第 2 節 実験材料および実験方法

III-2-1 実験材料および試薬

TMPD は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。コーン油は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA) より購入した。メチルセルロースは信越化学 (Tokyo, Japan) より購入した。生理食塩水は大塚製薬工場 (Tokushima, Japan) より購入した。Compound A - D およびイソプロテレノールは社内にて合成したものを使用した。TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、*mir*Vana PARIS Kit、Megaplex Primer Pools Rodent Pools、2× TaqMan Universal Master Mix NoAmp Erase UNG、TaqMan Rodent MicroRNA

Array v2.0 は Applied Biosystems より購入した。RNAiso Plus および Dr. GenTLE Precipitation Carrier はタカラバイオより購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または一級のものを用了。以下に本章で使用した試薬の組成を示した。前章までに述べた試薬等の記載については省略した。

III-2-2 化合物の投与と採血および組織採取

動物実験は、社内の動物実験委員会の指針に従って行った。8週齢の雄性 Sprague-Dawley系ラット (チャールスリバー, Shiga, Japan) を用了。ラットは一定の環境下で飼育し (室温20-26°C, 湿度40-70%, 12 h 明暗サイクル)、自由に給水および給餌させた。また、実験前には飼育環境への馴化を行った。薬物誘導性骨格筋障害モデルを作製するため、雄性SDラットにコーン油に懸濁させたTMPDを4 mg/kg (n = 4 - 5)、1日2回3日間、皮下投与した。5回目の投与の3時間後、もしくは最終投与の16時間後に腹部大静脈より採血を行った後、大腿筋、下腿筋、横隔膜および頸多裂筋を採取した。今回、測定に用了血清を採取した過去社内試験における投与方法は次の通りである。9週齢の雌性SDラットに0.5% メチルセルロースに懸濁したcompound Aを100 mg/kg (n = 2) もしくはcompound BまたはCを100 mg/kg (n = 2) か300 mg/kg (n = 2)、1日1回3日間、経口投与した。最終投与の24時間後に腹部大静脈より採血を行った後、大腿筋、下腿筋、横隔膜および頸多裂筋を採取した。さらに、9週齢の雌性F344系ラットに0.5%メチルセルロースに懸濁したcompound Dを300 mg/kg (n = 3)、単回経口投与した。投与の24時間後に腹部大静脈より採血を行った後、大腿筋、下腿筋、横隔膜および頸多裂筋を採取した。採取した血液は、血漿回収用のEDTAが入ったチューブと血清回収用チューブに分配し、遠心分離を行い、血漿と血清を回収した。血漿および血清は使用するまで-80°Cで保管した。また、採取した組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

miR-206の骨格筋障害に対する特異性を評価するため、心筋障害モデルを作成した。雄性SDラットに生理食塩水に溶解したイソプロテレノールを0.1 mg/kg (n = 10)、単回皮下投与した。24時間後に腹部大静脈より採血を行った後、心臓を採取した。血漿お

よび血清を回収し、使用するまで-80℃で保管した。また、採取した組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

III-2-3 血漿中および血清中マーカー値の測定

血漿中の CK および LDH は automated blood chemistry analyzer (Model 7170S; Hitachi, Tokyo, Japan) にて測定した。血清中 sTnI および Myl3 は Muscle Injury Panel 1 (rat) Assay Kit (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) を用いて SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics) にて測定した。

III-2-4 病理組織学的検査

ホルマリン固定した組織はパラフィン包埋後に 3 μ m の厚さにスライスし、スライドガラスに固定し、ヘマトキシリンおよびエオジンをを用いて染色した。壊死の程度は、4 つのグレード (-: なし、+: 軽微、++: 軽度、+++: 中等度) で評価した。

III-2-5 血清からの RNA の抽出および miR-206 発現量の測定

血清 50-200 μ L を用いて以下のように RNA を抽出した。200 μ L 以下の検体には Nuclease-free water を加え、全量を 200 μ L とした。QIAzol lysis reagent を 1 mL 添加し、ボルテックスで 10 秒間、混和した。室温で 5 分間静置した後、0.5 nM の合成 cel-miR-39 を 5 μ L 添加し、ボルテックスにて攪拌した。全量のサンプルを遠心分離した 5 PRIME Phase Lock Gel Tube Heavy (2 mL tube) に移した後、クロロホルムを 200 μ L 添加し、ボルテックスにて、15 秒間攪拌した。室温で 2 分間静置した後、4℃, 12,000 g で 15 分間遠心分離した。上層 600 μ L を別のサンプルチューブに採取し、これを RNA を自動で抽出する機械である QIAcube (QIAGEN, Hilden, Germany) にセットした。RNA 抽出条件を、protocol : miRNeasy Serum/Plasma、Elution Volume : 30 μ L に設定し、RNA 抽出作業を開始した。

miScript II RT Kit のプロトコールに従い、以下の方法で cDNA を合成した。抽出した RNA 溶液 2 μ L に Nuclease-free water 4 μ L、miScript Reverse Transcriptase 1 μ L、10 \times miScript Nucleics Mix 1 μ L、5 \times miScript HiSpec Buffer 2 μ L を加え、全量を 10 μ L とした。その後、37 $^{\circ}$ C で 60 分間、95 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。

次に、miScript PreAMP PCR Kit (QIAGEN) のプロトコールに従い、以下の方法で preamplification 反応を行った。cDNA 溶液を 5 倍希釈し、その希釈液 5 μ L に Nuclease-free water 7 μ L、miScript PreAMP Universal Primer 1 μ L、HotStarTaq DNA Polymerase 2 μ L、5 \times miScript PreAMP Buffer 5 μ L を加えた。そこに、miR-206 および cel-miR-39 の miScript Primer Assays を等量ずつ混合した miScript Primer Assay Mixture 5 μ L を加え、全量を 25 μ L とした。95 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、60 $^{\circ}$ C で 3 分の反応を 12 サイクル行った。

miScript SYBR Green PCR Kit のプロトコールに従い、QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて以下の方法で定量的 real-time PCR を行った。Preamplification 溶液を 20 倍希釈し、その希釈液 1 μ L に Nuclease-free water 2 μ L、10 \times miScript Primer Assay 1 μ L、10 \times miScript Universal Primer 1 μ L、2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 5 μ L を加え、全量を 10 μ L とした。95 $^{\circ}$ C で 15 分反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 15 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、70 $^{\circ}$ C で 30 秒の反応を 40 サイクル行った。

検量線は以下の方法で作成した。合成 RNA (rno-miR-206, 5'-UGGAAUGUAAGGAA GUGUGUGG-3') (Hokkaido System Science, Sapporo, Japan) について、 6.67×10^3 pmol/L から 1.39 pmol/L の 15 段階の希釈液を調製した。その希釈液を用いて測定検体と同様に測定を行い、各希釈液の Ct 値と濃度から検量線を作成した。miR-206 の濃度は cel-miR-39 の Ct 値で補正した miR-206 の Ct 値を用いて、検量線に従って算出した。

III-2-6 頻回採血が血清中 miR-206 および Myl3 値に与える影響

雄性 SD ラットに 0.5% メチルセルロースを単回経口投与した (n = 6)。投与の 0.5、1、2、4、8 時間後に尾静脈より、24 時間後に腹部大動脈より採血を行った。血液は、

採取した後遠心分離を行い、血清を回収し、使用するまで-80℃で保管した。miR-206 は III-2-5 に、My13 は III-2-3 に準じて測定した。

III-2-7 統計解析

Graphpad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。F 検定の結果に基づき、多群間の検定には Wilcoxon test を、2 群間の検定には Student's *t*-test を用いた。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意とした。ROC (Receiver operator characteristic) 解析には、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た。パラメーターの感度と特異性は、ROC 解析の結果を用いて、Youden's index ($= \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$) で最大値を示した値を閾値として、算出した。

第 3 節 実験結果

III-3-1 骨格筋障害モデルラットの評価

骨格筋障害のモデル動物作製に頻用されている TMPD を用いた。TMPD 5 回目投与 3 時間後および 6 回目投与 16 時間後の病理組織学的検査の結果を Table 3 に示す。投与 3 時間および 16 時間後ともに、大腿筋、下腿筋、頸多裂筋および横隔膜に軽微から中等度の壊死が認められた。従って、TMPD 群では骨格筋壊死が引き起こされていることが示され、骨格筋障害モデルが作製されたことを確認した。

非臨床毒性試験では、軽微から軽度の骨格筋障害が認められることが多いことから、よりマイルドな骨格筋障害時の血中 miR-206 の変動を評価するため、過去試験において、骨格筋障害が認められた compound A、B、C および D を投与したラットから採取した血清を用いて血中 miR-206 を測定した。Compound A - D 投与後の病理組織学的検査の結果を Table 3 に示す。Compound A 投与では 2 匹中 1 匹において、compound B

投与では全ての個体において、compound C 投与では、4 匹中 3 匹において頸多裂筋に壊死が認められた。Compound D 投与では、全ての個体において大腿筋、下腿筋または頸多裂筋のいずれかに壊死が認められた。なお、壊死の程度は軽微から中等度であった。

Table 3. Histopathological changes in the skeletal muscles in rats treated with TMPD or in-house compounds.

Compound	Dose (mg/kg)	No. of animals	Femoral muscle	Crural muscle	Cervical multifidus muscle	Diaphragm
TMPD 3 hours	4	4	+++ (1), ++ (2), + (1)	++ (2), + (2)	++ (1), + (3)	++ (2), + (2)
TMPD 16 hours	4	5	+++ (1), ++ (3), + (1)	++ (2), + (3)	++ (1), + (4)	++ (1), + (4)
Compound A	100	2	-	NE	+ (1)	NE
Compound B	100	2	-	NE	+ (2)	NE
	300	1	+ (1)	NE	+ (1)	NE
Compound C	100	2	-	NE	+ (2)	NE
	300	2	-	NE	+ (1)	NE
Compound D	100	3	++ (2), + (1)	++ (2)	+++ (1), + (1)	NE

NE: not evaluated. Histopathological grade of necrosis: very slight: +, slight: ++, moderate: +++. The numbers in parentheses represent the numbers of animals.

III-3-2 骨格筋障害モデルラットにおける血漿中 CK、LDH と血清中 miR-206、sTnI および Myl3 の変化

次に骨格筋障害モデルラットの血漿中 CK および LDH、血清中 miR-206、sTnI および Myl3 の値を測定した。TMPD 投与 5 回目投与 3 時間および 6 回目投与 16 時間後の血漿中 CK、LDH と血清中 miR-206、sTnI および Myl3 値を Fig. 3 に示す。5 回目の投与から 3 時間後において、CK、sTnI および Myl3 は対照群と比べて TMPD 群では高い値を示す傾向が認められた。また、LDH および miR-206 は対照群と比べて TMPD

群で有意に高い値を示した (Fig. 3A)。さらに、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。

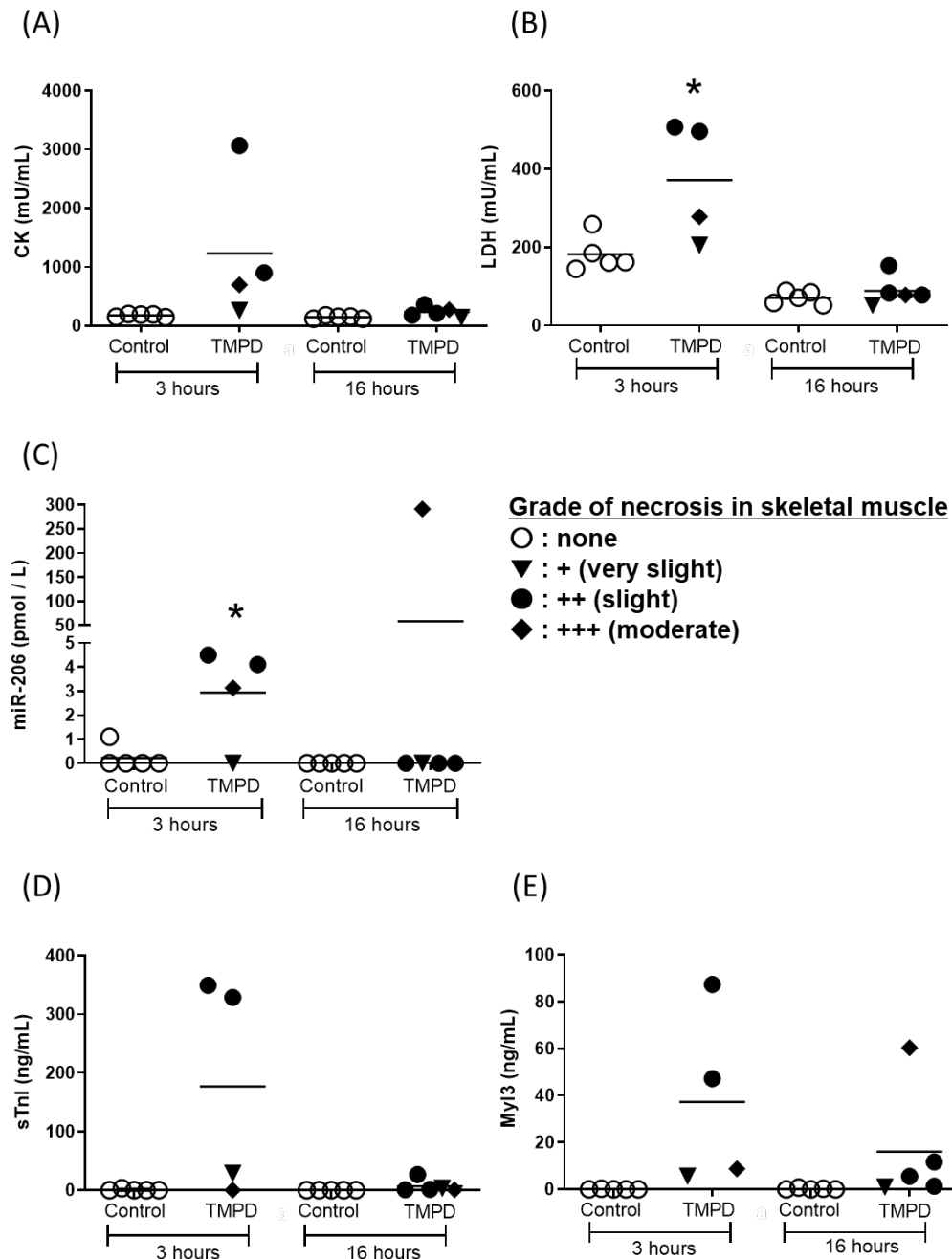


Fig. 3. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in TMPD-treated rats. Blood samples 3 hours after the 5th administration and 16 hours after the last (6th) administration were used. ○, no necrosis in the skeletal muscle; ▼, + (very slight); ●, ++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

一方、1 匹ではあるものの TMPD 群において大腿筋に壊死が認められた個体で miR-206 および Myl3 が高い値を示した。従って、miR-206 は骨格筋障害によって、血中での値が増加することが明らかとなった。

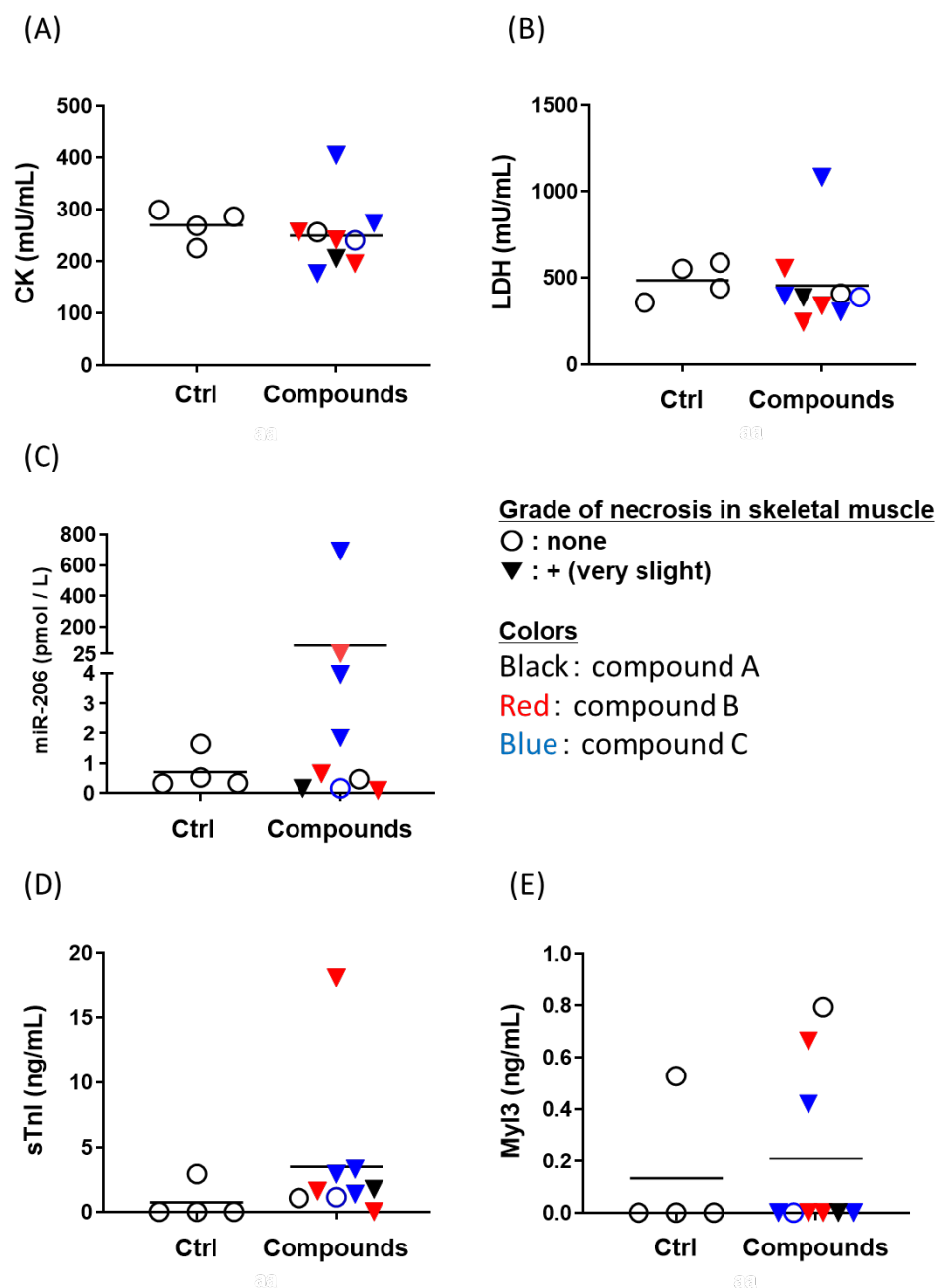


Fig. 4. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in compound A, B and C-treated rats. Blood samples 24 hours after administration were used. ○, no necrosis in the skeletal muscle; ▼, + (very slight) of necrosis of skeletal muscle. Black, red and blue colors represent rats treated with compound A, B and C, respectively.

次に、compound A - C投与後24時間の血漿中CK、LDHと血清中miR-206、sTnIおよびMyl3値をFig. 4に示す。なお、compound Dは実験に用いたラットの系統及び性別の違いからcompound A - Cのデータは別に解析した。miR-206はcompound A - C投与群で高値を示す傾向が認められた。一方、他のパラメーターは対照群と同程度の値を示した。

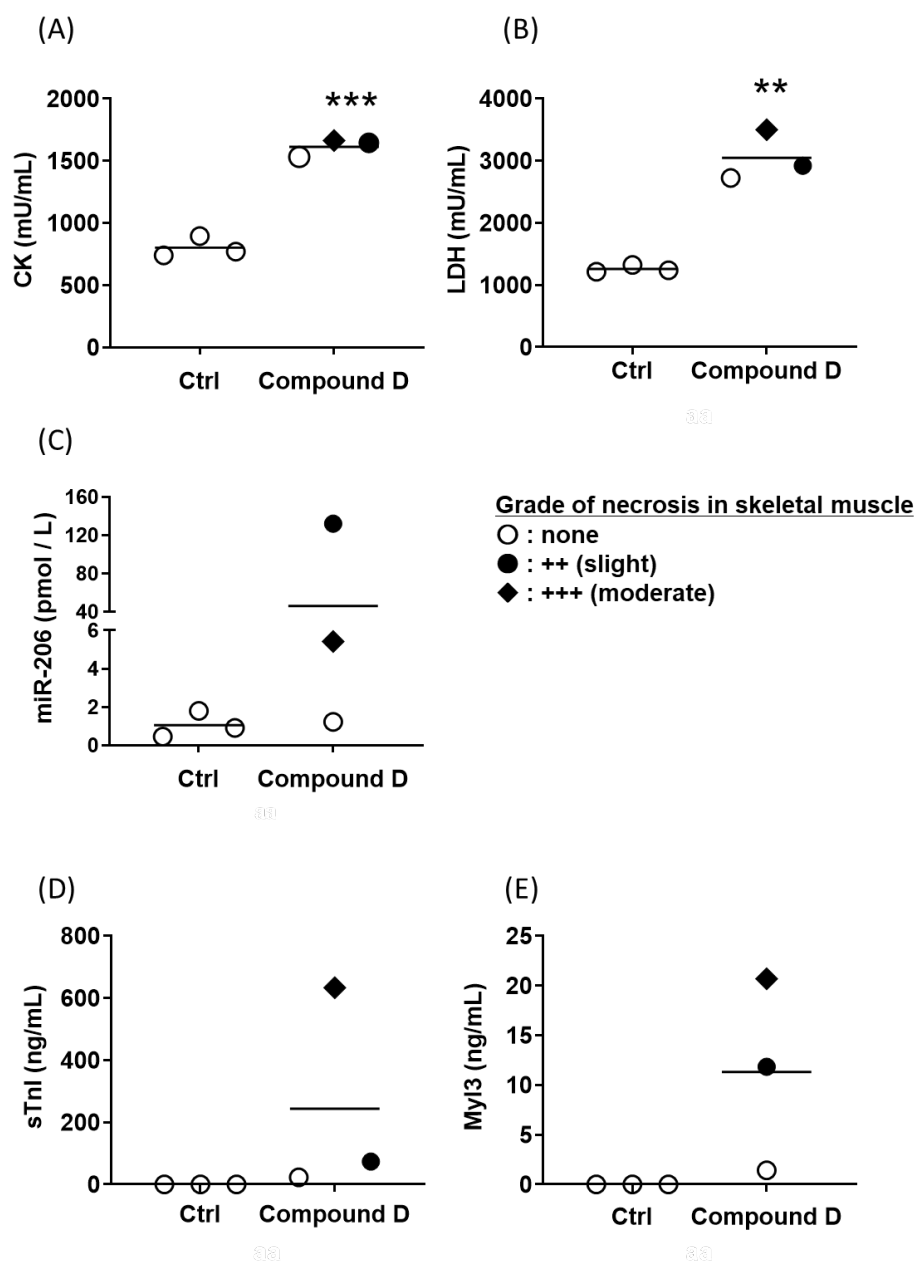


Fig. 5. Changes in the levels of circulating CK (A), LDH (B), miR-206 (C), sTnI (D) and Myl3 (E) levels in compound D-treated rats. ○, no necrosis in the skeletal muscle; ●, 2+ (slight) of necrosis of skeletal muscle. Blood samples 24 hours after the last administration were used. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ as compared time matched control group

次に、compound D 投与後 24 時間後の血漿中 CK、LDH と血清中 miR-206、sTnI および Myl3 値を Fig. 5 に示す。Compound D 投与群では CK および LDH で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. 5)。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。従って、miR-206 は骨格筋障害を検出可能であることが明らかとなった。

III-3-3 CK, LDH, miR-206, sTnI および Myl3 の骨格筋障害バイオマーカーとしての感度と特異性

バイオマーカーとしての有用性を評価するため、ROC 解析を用いて CK、LDH、miR-206、sTnI および Myl3 の感度および特異性を算出した (Table 4)。各パラメーターの感度および特異性はそれぞれ、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、miR-206 は他のパラメーターよりも特異性が高く、感度は低いことが明らかとなった。ROC 曲線下面積を AUC (area under the curve) とよび、値が 1 に近いほどバイオマーカーとしての精度が高いことを示す。AUC は sTnI が最も高い値を示した。

Table 4. Sensitivity and specificity evaluated with optimal cut off points.

Parameters	AUC	Cut off	Sensitivity	Specificity
CK	0.66	195	83	45
LDH	0.52	195	72	45
miR-206	0.71	1.83	56	100
sTnI	0.85	0.41	89	75
Myl3	0.84	0.36	78	85

The cut off values were selected to maximize the Youden's index ($[J] = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$).

次に、miR-206 の骨格筋障害への特異性を評価するため、血清中 miR-206 がイソプ

ロテレノール誘発性心筋壊死の際に変化するか検討した。病理組織学的検査の結果を Table 5 に示す。イソプロテレノールを投与した全てのラットで軽微から軽度の心筋壊死が認められた。心臓にも発現が認められる Myl3 はイソプロテレノール投与群で対照群と比較して有意に高い値を示した (Fig. 6)。これに対し、血清中 miR-206 は対照群と比較して変化は認められなかった。以上の結果より、miR-206 は骨格筋障害に特異的なバイオマーカーである可能性が示された。

Table 5. Histopathological changes in the heart by single administration of isoproterenol.

Compound	Dose (mg/kg)	Number of animals	Necrosis
Isoproterenol	0.1	10	++(3), +(7)

Histopathological grade of necrosis: very slight: +, slight: ++. The number in parentheses describes number of animals.

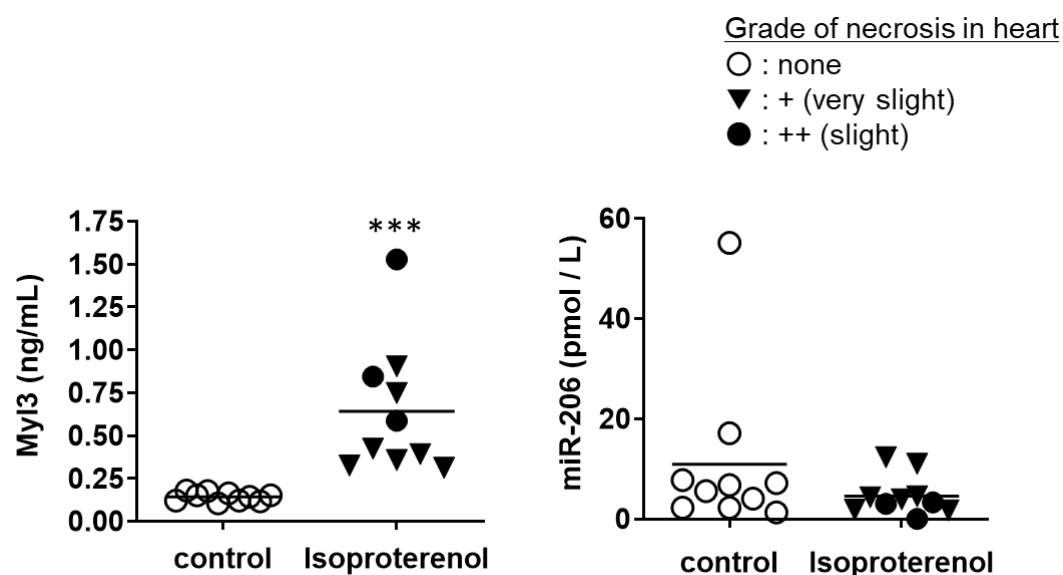


Fig. 6. Changes in the levels of miR-206 and Myl3 in isoproterenol-treated rats. ○, no necrosis in the cardiomyocyte; ▼, 1+ (very slight); ●, 2+ (slight) of necrosis of cardiomyocyte. ***: $p < 0.001$ compared with control.

III-3-4 頻回採血が血中 miR-206 発現量に与える影響

過去試験の結果から、骨格筋に発現している CK や LDH は頻回採血により血中の値が増加することが確認されている (data not shown)。そこで、頻回採血が miR-206 発現量に与える影響を評価した (Fig. 7)。その結果、2、3 もしくは 4 回目の採血時点において、最初の採血時の miR-206 の値と比較して 2 - 5 倍程度の増加を示したが、骨格筋障害時には約 100 倍程度変化しており (Fig. 3-5.)、頻回採血による変動は骨格筋障害時の変動と比べて程度は低かった。従って、miR-206 は頻回採血の影響を受けにくい骨格筋毒性バイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。

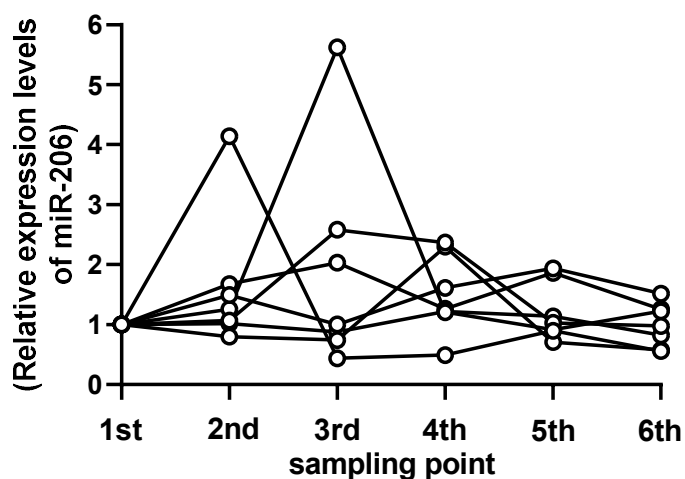


Fig. 7. Effects of frequent blood sampling on serum miR-206. Sampling points were 0.5 h (1st), 1 h (2nd), 2 h (3rd), 4 h (4th), 8 h (5th), and 24 h (6th) after dosing. Values are relative to that in the first sampling point.

第 4 節 考察

本研究では、血中 miR-206 が非臨床毒性試験において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、さらに既存のバイオマーカーと比較して、感度および特異性が優れた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。

ヒトや動物の筋障害や筋疾患のバイオマーカーとして CK や LDH が頻用されてきた。しかしながら、CK は骨格筋に加え、心臓や脳での発現量が高いことから、筋障害以外でも血漿中で高値を示すことが知られている (Grindem et al., 2017)。同様に、LDH は骨格筋以外でも肝臓、血液および心臓に発現していることが知られており、これらの臓器障害と区別することはできない (Frank et al., 1978; Grindem et al., 2017)。近年、CK や LDH に加えて、sTnI や Myl3 が筋疾患や筋障害のマーカーとして注目されている (Tonomura et al., 2012; Burch et al., 2016)。しかし、血中からの消失が早いこと (Tonomura et al., 2012) や Myl3 は心臓で発現が高いこと (Calvano et al., 2016) など、使用する上で不利な特性があり、骨格筋障害を検出するのにこれらのパラメーターでは不十分と考えられる。このように、既存のパラメーターより感度および特異性が優れたバイオマーカーの開発が急務となっている。

骨格筋に豊富に発現する miR-206 は骨格筋細胞の増殖や分化に関与していることが報告されている (Chen et al., 2010; Dey et al., 2011; Ma et al., 2015)。miR-206 が臨床で筋ジストロフィー (Hu et al., 2014) や骨格筋萎縮 (Wang et al., 2017)、筋萎縮性側索硬化症 (Toivonen et al., 2014) などの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。加えて、筋毒性を誘発するタイガースネーク由来毒素ノテキシンをラットに投与した際、血漿中の miR-206 が上昇することが報告されている (Siracusa et al., 2016)。しかしながら、血中 miR-206 が医薬品開発における非臨床毒性試験で薬剤性骨格筋障害の検出に利用可能は不明である。そこで、血中 miR-206 が CK、LDH、sTnI や Myl3 と比較して、非臨床毒性試験における薬剤性骨格筋障害の検出に有用か明らかにすることを目的として、本研究を行った。

血清中 miR-206 が骨格筋障害により増加するか明らかにするため、骨格筋障害のモデル動物作成に頻用されている TMPD をラットに投与し、骨格筋障害モデルラットを

作成した。TMPD を投与したラットにおいて、血清中 miR-206 は高い値を示した (Fig. 3)。さらに、マイルドな骨格筋障害時の血中 miR-206 の変動を評価するため、過去試験で骨格筋毒性を誘発した4つの社内化合物を投与したラットから採取した血清を用いた検討を行った。Compound B、C および D を投与したラットにおいて、血清中 miR-206 は高い値を示す傾向が認められた (Fig. 4 and 5)。miR-206 は骨格筋に多く発現していることから、他の骨格筋毒性バイオマーカーと同様に、骨格筋障害により骨格筋中の miR-206 が血中に漏出すると考えられた。本研究では、TMPD および compound A - C は SD ラットに、compound D は F344 ラットに投与しているが、両系統で骨格筋障害により血中 miR-206 の値は増加したことから (Fig. 3-5)、血中 miR-206 はラットの系統によらずバイオマーカーとして利用できる可能性が明らかになった。また、本研究により、軽微な壊死でも血中 miR-206 は増加することが明らかとなった。次に、miR-206 と CK、LDH、sTnI および Myl3 の骨格筋障害時における血中での変化を比較したところ、TMPD 投与ラットにおいて、CK、LDH および sTnI は投与 16 時間後には対照群と同程度の値を示したのに対し、miR-206 および Myl3 は高い値を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。さらに、compound A - C 投与ラットにおいて、CK、LDH、sTnI および Myl3 は変化が認められなかったのに対し、miR-206 は高値傾向を示した (Fig. 4)。これらの結果から、miR-206 は骨格筋障害を感度良く検出可能であることが示唆された。加えて、心筋障害時には血清中 miR-206 は変化しないことが明らかになった (Fig. 6)。以上、miR-206 は他のパラメーターよりも特異的に骨格筋障害を検出できることが明らかとなった。

非臨床毒性試験において、頻回採血するトキシコキネティクスサンプルをバイオマーカー測定に用いることがあるが、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過去の検討から明らかになっている。そこで、血清中 miR-206 は頻回採血により増加するか検討を行った結果、頻回採血により最大 5 倍程度の軽微な増加を示した (Fig. 7)。針刺しの繰り返し、もしくは保定のストレスにより採血部位などの筋肉が傷ついたことにより、miR-206 が骨格筋から血中に漏出したものと考えられた。しかしながら、骨格筋障害時の変動に比べ、軽微であることから、miR-206 を骨格筋障害のバイオマーカーとして使用可能であると考えられた。

近年、血漿中 miR-1、miR-133a、miR-133b および miR-206 の薬剤誘発性骨格筋障害バイオマーカーとしての有用性が報告された (Bailey et al., 2019)。加えて、血清中の miR-133a および miR-133b が骨格筋や心筋障害に対して感度が高いマーカーとなり得ることが報告された (Calvano et al., 2016)。さらに Calvano らは、骨格筋障害と心筋障害を区別するために、心臓に特異的に発現する miR-208 を組み合わせて測定することを提案している。本検討により、miR-206 は骨格筋障害でのみ変化することが明らかとなったことから、単一の miRNA で骨格筋障害を検出することが可能であるという点において、miR-206 は miR-133a や miR-133b よりも優れていると考えられた。

以上、本章では miR-206 が既存のパラメーターよりも骨格筋障害を特異的に検出可能なバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。これより、血清中 miR-206 は非臨床毒性試験における骨格筋障害リスクのスクリーニングに利用可能であると考えられた。

総括

血中 miRNAs は近年バイオマーカーとして注目されてきており、既存マーカーでは感度や特異性に課題のある肝障害や骨格筋障害を含む様々な疾患で、その有用性が示唆されている。しかしながら、肝障害に関しては、ある一種類の肝障害患者と健常人での血中 miRNA の変化を比較している研究が多く、肝障害の種類を分類可能かは不明であり、臨床現場での実用には至っていない。筆者らは過去の検討において、薬剤性肝障害、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) または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きた (Yamaura et al., 2012)。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できるか明らかにすることを目的とし、様々な病型の肝障害患者の血清中 miRNA の発現プロファイルを評価した。また、骨格筋障害に関しては、骨格筋に高発現する miR-206 について臨床検体を用いてバイオマーカーとしての検討を行っている報告は多数存在するものの、非臨床検体を用いて評価した報告はなく、非臨床試験で利用可能かは不明である。そこで本研究では、血中 miR-206 が非臨床毒性試験で薬剤性骨格筋障害のバイオマーカーとなるか明らかにすることを目的とし、モデルラットの構築、もしくは過去社内試験の残検体を使用して評価を行った。

第一に、ヒトにおいて様々な肝障害で血中 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ため、B 型肝炎、C 型肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、NASH および薬物性肝障害に罹患した計 32 名の患者および 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行った。その結果、対照群と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 が 37 種類存在することが明らかになった。また、これらの miRNAs について主成分分析を用いた発現プロファイルの評価することで、対照群と肝障害群、さらにそれぞれの肝障害群ごとに明確に区別することが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 を用いることで、ヒト肝障害の病型・病因を診断できる可能性が示された。

第二に、血中 miR-206 が非臨床毒性試験における骨格筋障害のバイオマーカーとな

るか明らかにするため、骨格筋障害を引き起こすことが知られている TMPD を用いて、骨格筋障害モデルラットを作製し、血中 miR-206 および臨床等で骨格筋障害のマーカーとして使用されている CK、LDH、sTnI および Myl3 の測定を行った。加えて、過去社内試験で骨格筋障害が認められた開発化合物 (compound A - D) を投与したラットから採取した血清の残検体を用いて、各種パラメーターの測定を行った。その結果、血中 miR-206 は骨格筋障害により値が増加することが明らかになった。さらに CK、LDH、sTnI および Myl3 との比較から、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。さらに、イソプロテレノール誘導性心筋壊死では、Myl3 は血中で増加が認められたのに対し、miR-206 は変化しないことが明らかになった。以上の結果から、血中 miR-206 の骨格筋障害のバイオマーカーとしての有用性が示された。

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出来るバイオマーカーとなり得ること、また、血中 miR-206 はラットを使用し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。

参考文献

- Ambros V (2001) microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* **107**: 823-826.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G and Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**: 277-279.
- Antoine DJ, Mercer AE, Williams DP and Park BK (2009) Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica* **39**: 565-577.
- Bailey WJ, Barnum JE, Erdos Z, LaFranco-Scheuch L, Lane P, Vlasakova K, Sistare FD and Glaab WE (2019) A performance evaluation of liver and skeletal muscle-specific miRNAs in rat plasma to detect drug-induced injury. *Toxicol Sci* **168**: 110-125.
- Bonci D, Coppola V, Patrizii M, Addario A, Cannistraci A, Francescangeli F, Pecci R, Muto G, Collura D, Bedini R, Zeuner A, Valtieri M, Sentinelli S, Benassi MS, Gallucci M, Carlini P, Piccolo S and De Maria R (2016) A microRNA code for prostate cancer metastasis. *Oncogene* **35**: 1180-1192.
- Border WA and Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**: 1286-1292.
- Bracken CP, Scott HS and Goodall GJ (2016) A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat Rev Genet* **17**: 719-732.
- Burch PM, Greg Hall D, Walker EG, Bracken W, Giovanelli R, Goldstein R, Higgs RE, King NM, Lane P, Sauer JM, Michna L, Muniappa N, Pritt ML, Vlasakova K, Watson DE, Wescott D, Zabka TS and Glaab WE (2016) Evaluation of the relative performance of drug-induced skeletal muscle injury biomarkers in rats. *Toxicol Sci* **150**: 247-256.
- Calvano J, Achanzar W, Murphy B, DiPiero J, Hixson C, Parrula C, Burr H, Mangipudy R and Tirmenstein M (2016) Evaluation of microRNAs-208 and 133a/b as differential biomarkers of acute cardiac and skeletal muscle toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **312**: 53-60.
- Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN and Beretta L (2011) Circulating

- microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* **6**: e23937.
- Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X and Wang DZ (2010) microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol* **190**: 867-879.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J and Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **18**: 997-1006.
- Devaux Y, Creemers EE, Boon RA, Werfel S, Thum T, Engelhardt S, Dimmeler S and Squire I (2017) Cardiolinc network. Circular RNAs in heart failure. *Eur J Heart Fail* **19**: 701-709.
- Dey BK, Gagan J and Dutta A (2011) miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol* **31**: 203-214.
- Ding X, Ding J, Ning J, Yi F, Chen J, Zhao D, Zheng J, Liang Z, Hu Z and Du Q (2012) Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for liver injury. *Mol Med Rep* **5**: 1428-1432.
- Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC and Jones KW (2011) Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One* **6**: e20769.
- Eman SR, Kubesy AA, Baraka TA, Torad FA, Shaymaa IS and Mohammed FF (2018) Evaluation of hepatocyte-derived microRNA-122 for diagnosis of acute and chronic hepatitis of dogs. *Vet World* **11**: 667-673.
- Feng YH and Tsao CJ (2016) Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep* **5**: 395-402.
- Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ and Watkins BF (1978) Effect of *in vitro* hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem* **24**: 1966-1970.
- Griffiths-Jones S (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* **32**: D109-111.

- Grindem CB, Neel JA and Escobar C (2017) Evaluation of skeletal muscle function and injury. Kurtz DM and Travlos GS. Quimby (3rd Eds.) The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Taylor and Francis, 476-511.
- Hu J, Kong M, Ye Y, Hong S, Cheng L and Jiang L (2014) Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem* **129**: 877-883.
- Iguchi T, Sakurai K, Tamai S and Mori K (2018) Circulating liver-specific microRNAs in cynomolgus monkeys. *J Toxicol Pathol* **31**: 3-13.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D and Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647.
- Kalaria D and Wassenaar W (2002) Rhabdomyolysis and cerivastatin: was it a problem of dose? *CMAJ* **167**: 737.
- Kreth S, Hübner M and Hinske LC (2018) MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesth Analg* **126**: 670-681.
- Laterza OF1, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD and Glaab WE (2009) Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* **55**: 1977-1983.
- Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843-854.
- Lin KY, Ye H, Han BW, Wang WT, Wei PP, He B, Li XJ and Chen YQ (2016) Genome-wide screen identified let-7c/miR-99a/miR-125b regulating tumor progression and stem-like properties in cholangiocarcinoma. *Oncogene* **35**: 3376-3386.
- Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E and Keller A (2016) Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* **44**:3865-3877.
- Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N (2005) Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* **41**: 380-382.

- Noren HN, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB and Evans MK (2010) microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One* **5**: e10724.
- Ma G, Wang Y, Li Y, Cui L, Zhao Y, Zhao B and Li K (2015) MiR-206, a key modulator of skeletal muscle development and disease. *Int J Biol Sci* **11**: 345-352.
- Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Ann Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
- Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, Takeda S and Hashido K (2014) Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for limb-girdle muscular dystrophy, facioscapulohumeral muscular dystrophy, and becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med* **19**: 452-458.
- Matziolis D, Wassilew G, Strube P, Matziolis G and Perka C (2011) Differences in muscle trauma quantifiable in the laboratory between the minimally invasive anterolateral and transgluteal approach. *Arch Orthop Trauma Surg* **131**: 651-655.
- Minami K, Uehara T, Morikawa Y, Omura K, Kanki M, Horinouchi A, Ono A, Yamada H, Ohno Y and Urushidani T (2014) miRNA expression atlas in male rat. *Sci Data* **1**: 140005.
- Mihelich BL, Maranville JC, Nolley R, Peehl DM and Nonn L (2015) Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. *PLoS One* **10**: e0124245.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB and Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10513-10518.
- Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B and Heller A (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*

32: 56-67.

- Oosthuyzen W, Ten Berg PWL, Francis B, Campbell S, Macklin V, Milne E, Gow AG, Fisher C, Mellanby RJ and Dear JW (2018) Sensitivity and specificity of microRNA-122 for liver disease in dogs. *J Vet Intern Med* **32**: 1637-1644.
- Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Mollnow T, Zimmermann HW, Koch A, Hellerbrand C, Weiskirchen R, Frey N, Tacke F, Trautwein C and Luedde T (2013) miR-133a mediates TGF- β -dependent derepression of collagen synthesis in hepatic stellate cells during liver fibrosis. *J Hepatol* **58**: 736-742.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C and Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**: 209-218.
- Ruvkun G (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* **294**: 797-799.
- Sanjay S and Girish C (2017) Role of miRNA and its potential as a novel diagnostic biomarker in drug-induced liver injury. *Eur J Clin Pharmacol* **73**: 399-407.
- Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T and Viña J (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* **263**: R992-995.
- Shrivastava S, Petrone J, Steele R, Lauer GM, Di Bisceglie AM and Ray RB (2013) Up-regulation of circulating miR-20a is correlated with hepatitis C virus-mediated liver disease progression. *Hepatology* **58**: 863-871.
- Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja MN and Das S (2013) Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Sci Rep* **3**: 1555.
- Simpson JA, Labugger R, Collier C, Brison RJ, Iscoe S and Van Eyk JE (2005) Fast and slow skeletal troponin I in serum from patients with various skeletal muscle disorders: a pilot study. *Clin Chem* **51**: 966-972.
- Siracusa J, Koulmann N, Bourdon S, Goriot ME and Banzet S (2016) Circulating miRNAs as

- biomarkers of acute muscle damage in rats. *Am J Pathol* **186**: 1313-1327.
- Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DG, Antoine DJ, French NS, Dhaun N, Webb DJ, Costello EM, Neoptolemos JP, Moggs J, Goldring CE and Park BK (2011) Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* **54**: 1767-1776.
- Szabo G and Bala S (2013) MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**: 542-552.
- Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR and Goel A (2013) Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **105**: 849-859.
- Toivonen JM, Manzano R, Oliván S, Zaragoza P, García-Redondo A and Osta R (2014) MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **9**: e89065.
- Tonomura Y, Matsushima S, Kashiwagi E, Fujisawa K, Takagi S, Nishimura Y, Fukushima R, Torii M and Matsubara M (2012) Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats. *Toxicology* **302**: 179-189.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T and Yokoi T (2006) MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* **66**: 9090-9098.
- Wang F, Wang J, He J, Li W, Li J, Chen S, Zhang P, Liu H and ChenX (2017) Serum miRNAs miR-23a, 206, and 499 as potential biomarkers for skeletal muscle atrophy. *Biomed Res Int* **2017**: 8361237.
- Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D and Galas DJ (2012) Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* **7**: e41561.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE and Galas DJ (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4402-4407.
- Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, Fukami T, Tsuneyama K and Yokoi T (2012) Plasma

microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis.

PLoS One **7**: e30250.

Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M and Sun S (2010) Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* **56**: 1830-1838.

Zhu HJ, Han ZY, He SF, Jin SY, Xu SJ, Fang XD and Zhang Y (2017) Specific MicroRNAs comparisons in hypoxia and morphine preconditioning against hypoxia-reoxygenation injury with and without heart failure. *Life Sci* **170**: 82-92.

村脇義和, 川崎寛中 (1999) 肝線維化の病態生理 日本消化器病学会雑誌 **96**: 1143-1152.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健学域薬物代謝安全性学研究室教授 中島 美紀博士、准教授 深見 達基博士に深甚なる謝意を表します。薬剤性骨格筋障害モデルラットにおける miR-206 の有用性検討を行うにあたり、血漿中および血清中マーカー値を測定して下さいましたアステラス製薬株式会社 神吉 将之博士、佐々木 大祐博士および、病理組織学的評価をご実施下さいました小野美穂子博士に御礼申し上げます。

肝障害患者血清を御供与下さいました富山大学医学部第三内科 准教授 田尻 和人博士、地域医療総合支援学講座 客員教授 峯村 正実博士に御礼申し上げます。

本研究成果は以下の誌上で発表した。

Yamaura Y, Tatsumi N, Takagi S, Tokumitsu S, Fukami T, Tajiri K, Minemura M, Yokoi T and Nakajima M (2017) Serum microRNA profiles in patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, or drug-induced liver injury. *Clin Biochem* **50**:1034 - 1039.

Yamaura Y, Kanki M, Sasaki D, Nakajima M and Unami A (2020) Serum miR-206 as a biomarker for drug-induced skeletal muscle injury in rats. *J Toxicol Sci* **45**:503 - 513.