

産生を促している可能性があることが報告されており⁷⁾、ウイルス性肝炎においてエクソソームがウイルス粒子を伝搬することのみならず細胞性免疫についての情報を他の細胞に伝えることによって病態の進展に影響している可能性がある(図 4)。

・エクソソームを標的としたウイルス性肝炎の治療の展望

HCV 感染肝細胞のエクソソームのプロセッシングを阻害することは、肝炎ウイルスの伝播を抑制することが考えられるが、本治療法の臨床応用についてはいくつかの課題がある。例えば、がん細胞の増殖において、正常細胞から分泌されるエクソソームががん細胞の増殖を抑えることが報告されているように⁸⁾、感染肝細胞が放出するエクソソームによってなされる肝組織の恒常性の維持を阻害してしまう可能性、また、エクソソームの分泌機構は Rab ファミリータンパクや中性スフィンゴミエリナーゼ 2 などが制御していると考えられるが現時点では不明な点が多く、どの経路を遮断することによって有効性が有害性を凌駕するのかが明らかではないことなどが挙げられる。またエクソソームは表面に多くの抗原を有しているために、特異的な抗原を表出することによって特異的な受容体を持つドナー細胞に、効果的にエクソソームの持つ情報を伝達することが想定され、新たなドラッグデリバリーシステムとしての有用性が期待される。

・おわりに

本稿では慢性肝疾患における分泌型 miRNA の臨床的意義について概説した。バイオマーカーとしてエクソソーム中の miRNA は有用であるが、現時点でエクソソームの定量系がないこと、宿主別のエクソソームを分別できないことが精度を上昇することの律速段階となっている。また miRNA やエクソソームの治療に対する応用も期待されるが、ドラッグデリバリーシステムの構築など実用化には多くの課題が残されている。今後のこの分野の発展に期待したい。

参考文献

- 1) Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431;350-355 2004
- 2) Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129;1401-1414 2007
- 3) Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9; 654-659 2007
- 4) Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, et al. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS One* 7; e48366 2012
- 5) Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N, et al. Tissue classification with gene expression

profiles. *J Comput Biol*.7; 559-83 2000.

6) Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110; 13109-13. 2013

7) Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host & Microbe* 12; 558-570 2012

8) Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*. 287; 1397-1405 2012

図表の説明

表 1. 末梢血 miRNA を利用した肝疾患診断に関する報告例

図 1. 肝臓における miRNA の役割

肝における miR-122 の発現と肝の代謝と疾患との関連

図 2 血液中の遺伝子診断のイメージ図

正常肝細胞から放出されるエクソソームと疾患由来細胞から放出されるエクソソームはエクソソームのプロセッシング中に内部に含まれる miRNA が異なり、これを分別することによって疾患の診断、病期の診断が可能である。

図 3 エクソソーム中の miRNA を用いた慢性肝疾患診断

a CHC と NL の診断能

b LOOCV を用いた CHC と NL の分別能

c CHB と NL の診断能

d LOOCV を用いた CHB と NL の分別能

e NASH と NL の診断能

f LOOCV を用いた NASH と NL の分別能

(PLoS ONE 2012 より改変)

図 4 エクソソームを介した肝炎ウイルスの伝播と周辺細胞への影響

①肝炎ウイルス感染肝細胞由来のエクソソームに肝炎ウイルスが存在し、

エクソソームを非感染肝細胞が取り込むことによりウイルス粒子が移行する。

②①と同様の機序でエクソソームを介して肝炎ウイルス粒子が

pDCに取り込まれ、IFN産生のトリガーとなる。

- ③正常細胞由来のエクソソームが肝炎ウイルス感染細胞の正常性の維持に影響している可能性がある(現時点では詳細は不明)。

図1

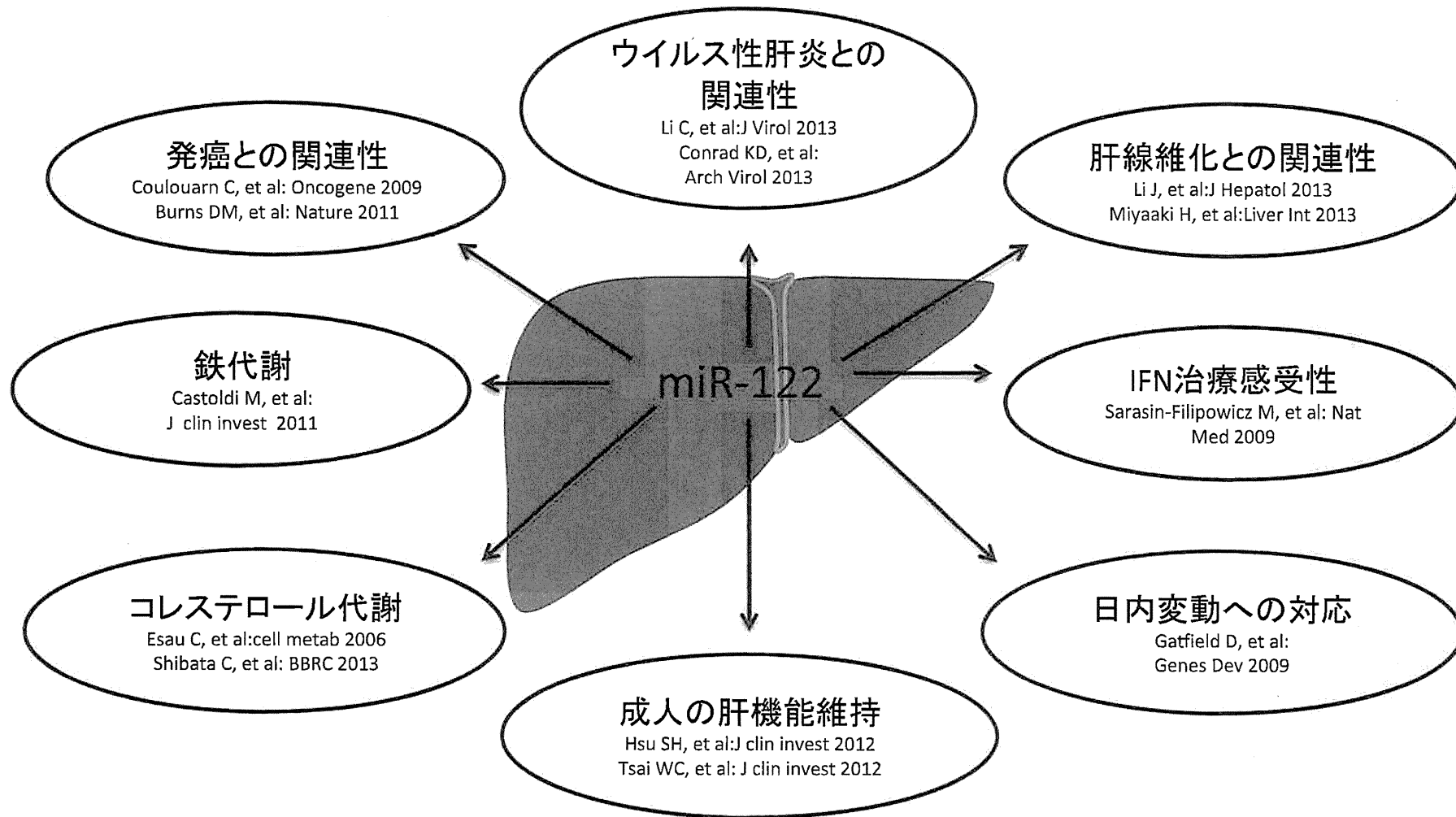


図2

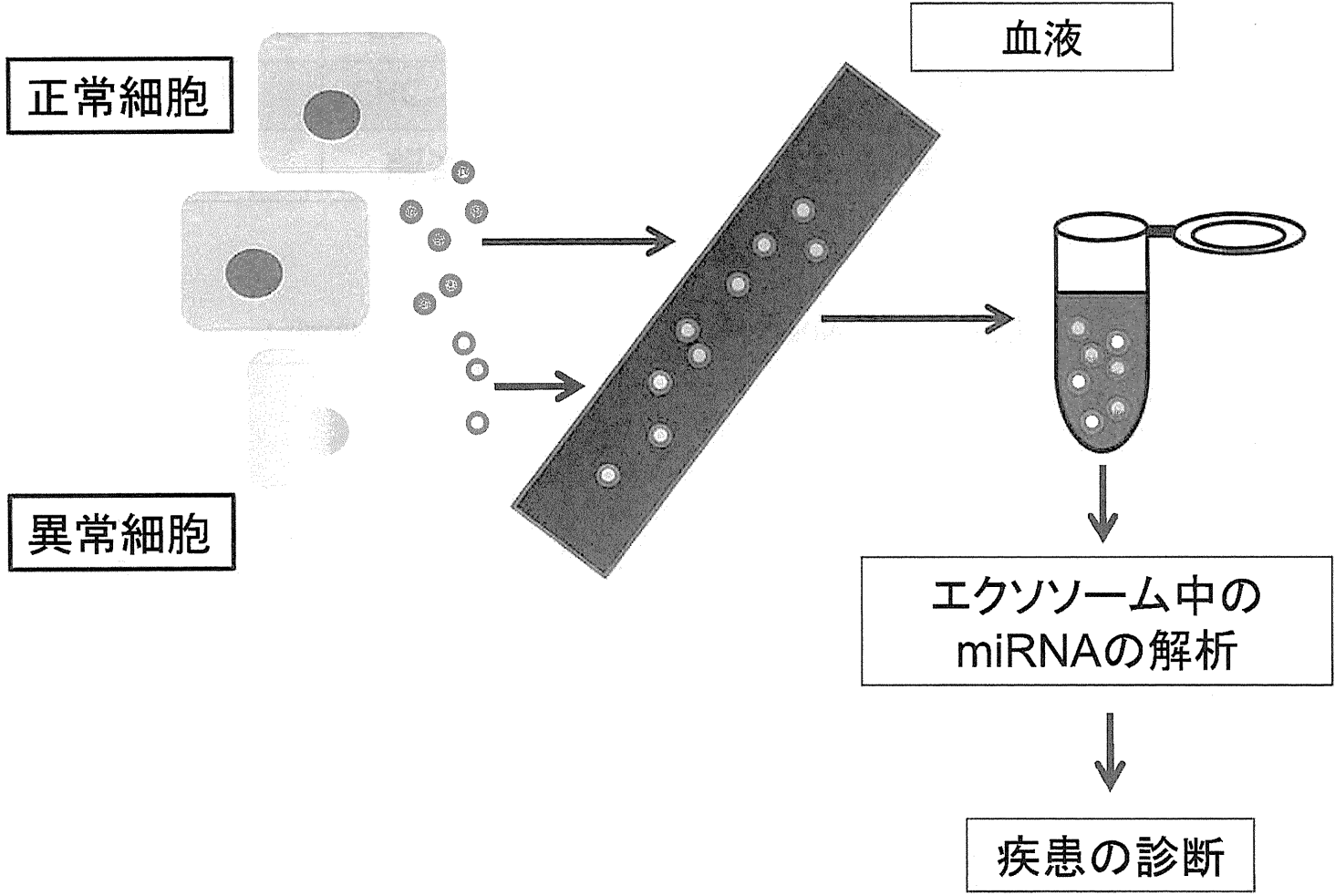
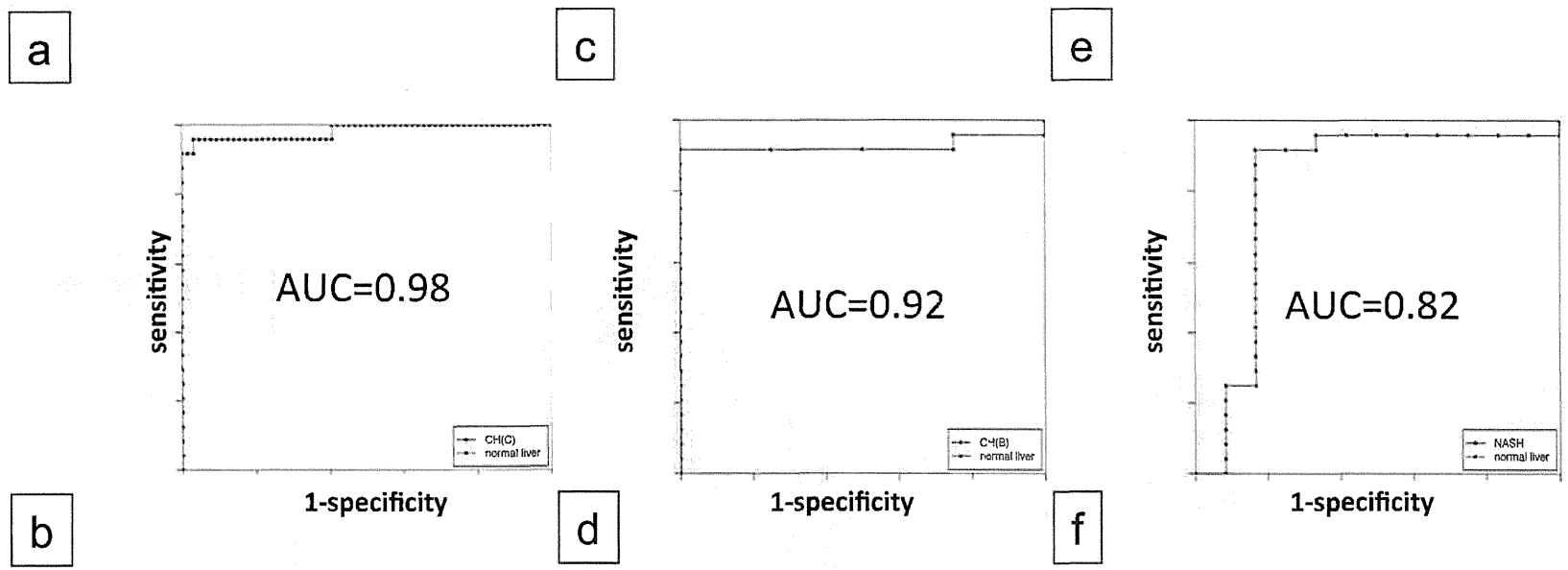


図3



		結果	
		CHC	NL
予想	CHC	63	3
	NL	0	21

		結果	
		CHB	NL
予想	CHB	3	2
	NL	1	22

		結果	
		NASH	NL
予想	NASH	10	2
	NL	2	22

図4

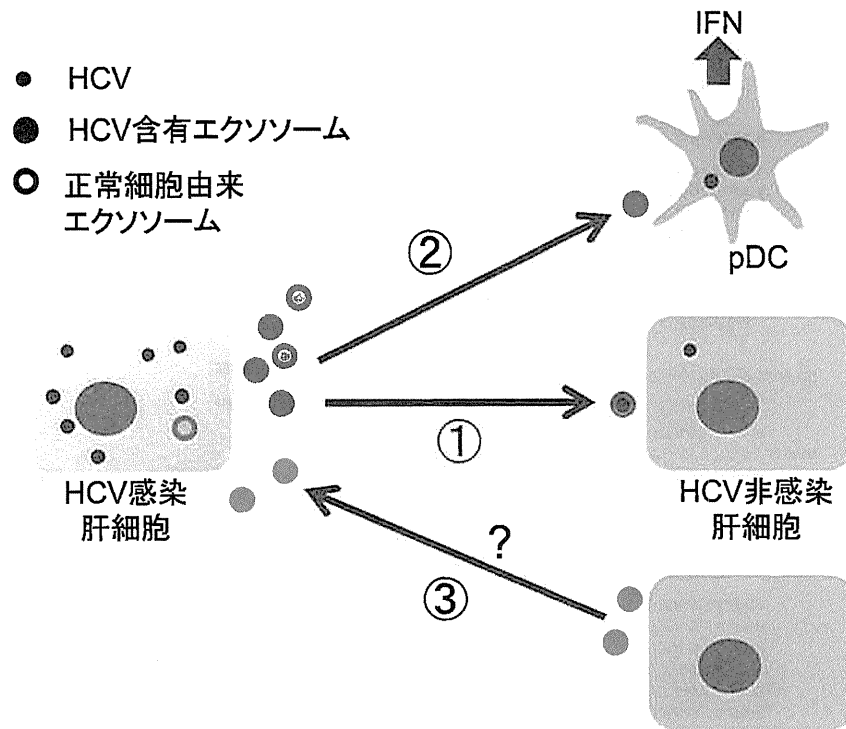


表1.末梢血miRNAを用いた肝疾患の報告

カテゴリー	症例・例数	同定されたmiRNA	解析法	検体	accuracy	文献
CHC関連	NL(19例), CHC(68例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血清	—	Bihrer V, et al: Am J Gastroenterol (2011)
	NL(19例), CHC(62例), HCC(29例)	miR-21	リアルタイムqPCR	血清	0.76	Bihrer V, et al: PLoS One (2011)
	NL(15例), HCVC(36例)	miR-320c, miR-483-5p, miR-134, miR-198	マイクロアレイ, リアルタイムqPCR	血清	—	Shwetha S, et al: Sci rep (2013)
	NL(24例), CHC(125例)	miR-122, miR-192	リアルタイムqPCR	血清	0.99	van der Meer AJ, et al: JVH (2013)
	NL(18例), CHC(38例)	miR-122, miR-125b, miR-146a, miR-155	リアルタイムqPCR	血清	—	Bala S, et al: J Transl Med (2012)
	CHC(164例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血清	—	Jonel Trebicka et al: J Hepatol (2013)
	NL(50例), HCC(136例), CHC(30例)	miR-21	リアルタイムqPCR	血漿	0.971	Tomimaru Y, et al: J Hepatol (2012)
	NL(22例), non-HCV LD(20例), HC(44例)	miR-20a, miR-92a	リアルタイムqPCR	血清, 血漿	論文参照	Shrivastava S, et al: Hepatology (2013)
	NL(80例), CHB(80例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血清	—	Chen Y, et al: FASEB J (2011)
	NL(34例), CHB(48例), HCC(70例)	miR-122, miR-222, miR-223	リアルタイムqPCR	血清	0.86	Qi P, et al: Plos One (2011)
CHB関連	NL(37例), aCHB(77例), CHB(101例), ACLF(135例)	miR-122, miR-194, miR-20a, miR-106a, let-7b, miR-19b, miR-223, miR-16, miR-92a	マイクロアレイ	血清	—	Ji F, et al: J Viral Hepat (2011)
	NL(19例), CHB(89例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血清	—	Waidmann O, et al: JVH (2012)
	NL(40例), CHB(83例), LD(15例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血漿	0.99	Zhang Y, et al: Clin Chem (2010)
	NL(57例), CHB(52例)	miR-26a, miR-221, miR-22*	リアルタイムqPCR	血清	—	Zhu HT, et al: Mol Biotechnol (2012)
	NL(19例), CHC(18例), NAFLD(34例)	miR-122, miR-34a, miR-16	リアルタイムqPCR	血清	0.96	Cermelli S, et al: PLoS One (2011)
	NL(21例), CHB(53例)	miR-583, miR-663	マイクロアレイ, リアルタイムqPCR	血清	0.776, 0.923	Zhang H et al: EBCAM (2013)
	NL(22例), CHB(198例)	miR-122, miR-22	リアルタイムqPCR	血清	—	Arataki K et al: JMV (2013)
	NL(60例), CHB(60例)	miR-99a, miR-100, miR-122, miR-122*, miR-125b, miR-192, miR-192*, miR-193b, miR-194, miR-215, miR-365, miR-455-5p, miR-455-3p, miR-483-3p, miR-885-5p, miR-1247	マイクロアレイ, リアルタイムqPCR	血漿	—	Winther TN et al: PLoS One (2013)
	NL(17例), LC(61例)	miR-513-3p, miR-571, miR-652	マイクロアレイ	血漿	0.96	Roderburg C, et al: Plos One (2012)
	NL(17例), LC(22例)	miR-181a, miR-181b	リアルタイムqPCR	血清	—	Wang B, et al: BBRC (2012)
HCC	NL(20例), HCC(46例)	miR-21, miR-221, miR-222, miR-224	リアルタイムqPCR	血清	—	Li J, et al: BBRC(2011)
	NL(71例), CLD(107例), HCC(105例)	miR-16, miR-195, miR-199a	リアルタイムqPCR	血清	—	Qu Kz, et al: J Clin Gastroenterol (2011)
NAFLD	NAFLD(67例)	miR-122	リアルタイムqPCR	血清	—	Miyaaki H, et al: Liver Int (2013)
その他	NL(25例), APAP ALI(53例)	miR-122, miR-192, miR-1, miR-218	リアルタイムqPCR	血清, 血漿	—	Starkey Lewis PJ, et al: Hepatology(2011)
複数疾患	NL(160例), CHB(135例), CHC(48例), OFC(60例), HCC(85例)	miR-10a, miR-125b, miR-92a, miR-23b, miR-23a	リアルタイムqPCR	血清	0.99	Li ML, et al: Cancer Res (2010)
	NL(167例), CHB(169例), LC(141例), HCC(457例)	miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, miR-801	リアルタイムqPCR	血漿	0.94	Zhou J, et al: JCO (2011)
	NL(24例), CHC(95例), CHB(16例), NASH(20例)	miR-1225-5p, miR-1275, miR-638, miR-762, miR-320c, miR-451, miR-1974, miR-630, miR-1207-5p, miR-720	マイクロアレイ	エクソソーム, 血清	—	Murakami Y, et al: PLoS One (2012)
	NL(51例), ASC(70例), CHB(107例), ACLF(76例)	miR-197, miR-150, miR-574-3p, miR-30a	マイクロアレイ, リアルタイムqPCR	PBMC	—	Li Chen et al: Gut and liver(2013)
	ASH(4例), HCV-LC(25例)	miR-19a, miR-20a, miR-150	リアルタイムqPCR	血清	—	Joshi D et al: Liver Transpl (2013)
	NL(24例), CHB(24例), NASH(20例)	miR-122, miR-638, miR-572, miR-575, miR-744, miR-30c	リアルタイムqPCR	血清	論文参照	Hui Zhang et al: WJG (2012)

aCHB:無症候性慢性B型肝炎, ACLF:慢性肝不全急性増悪, ASC:無症候性キャリアー, APAP ALI:アセトアミノフェン誘導性急性肝障害, OFC:cancer-free control, CHB:慢性B型肝炎, CHC:慢性C型肝炎, CLD:慢性肝疾患, HC:C型肝炎(急性・慢性), HCC:肝細胞がん, HCVC:HCVキャリアー, LC:肝硬変, LD:肝疾患によらない肝障害, NAFLD:非アルコール性脂肪性肝疾患, NASH:非アルコール性脂肪性肝炎, NL:正常肝, non-HCV LD:非HCV肝疾患, PBMC:ヒト末梢血単核細胞

エクソソーム中マイクロRNAを利用した慢性肝疾患診断法の開発

村上善基* 河田則文* 棚橋俊仁** 田口善弘***

索引用語：miRNA, 慢性肝炎, 肝線維化, exosome, ウイルス感染

1

はじめに—肝臓におけるマイクロRNA (miRNA) の発現と役割

miRNAは20bp程度のnon-coding RNAでメッセンジャーRNA (mRNA)に対して塩基配列相補的に結合する。miRNAは細胞質でRNA-induced silencing complex (RISC)をmRNAと形成し、mRNAの転写、翻訳を阻害し遺伝子発現調節(RNA干渉)を行う。このようなmRNAを標的遺伝子といい、ひとつのmiRNAは理論上数百の標的遺伝子を認識する可能性があり、生命現象を司っている¹⁾。ヒトでは1,600種の前駆体miRNAと2,042種の成熟型miRNAが存在している(miRbase ver.19.0 <http://www.mirbase.org/index.shtml>)。またmiRNAは臓器特異的な発現様式があり、肝組織で発現しているmiRNAのうち約70%をmiR-122が占める²⁾。肝臓におけるmiR-122の機能は多岐にわたりコレス

テロール合成³⁾、成人肝における肝機能の維持^{4,5)}、日内変動に関係する遺伝子の調節による肝機能の維持⁶⁾や肝発癌^{4,5,7,8)}との関連、肝の線維化^{4,5)}、肝の炎症⁹⁾にも深く関与している。

miR-122の機能で最も精力的に解析されているものはHCVの複製との関係で、Jopling¹⁰⁾らはmiR-122の発現を抑制するとHCVの複製が抑制されることを明らかにした。通常miRNAは標的遺伝子の発現を抑制するが、逆の発現様式で標的遺伝子を制御している理由として、(1) HCVの初期の段階で複製を制御しているinternal ribosomal entry site (IRES)の下流にmiR-122の結合部位があり、miR-122はIRESの活性を亢進する¹¹⁾、(2) *in vitro*の系においてHCVの生成にmiR-122は関与しない¹²⁾、(3) HCVにおけるmiR-122の認識部位は5'UTRと3'UTR領域の両方にあり、細胞の持つ核酸分解能やウイルス核酸提示能を弱める可能性がある¹³⁾、などが想定さ

Yoshiki MURAKAMI *et al* : Development of diagnostic method for the chronic liver disease by using the expression pattern of microRNA in exosome

*大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学 [〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3]

**神戸薬科大学薬学部医療薬学研究室

***中央大学理工学部物理学科

れている。現在miRNAを使った新たな薬剤(核酸創薬)として米国Santaris社が慢性C型肝炎に対して臨床治験を行っている。その臨床第Ⅱ相試験ではmiR-122の相補的な塩基配列を持ち、細胞内に発現しているmiR-122の機能を抑制するLNA-miR-122製剤であるmiravirsen (R)の5mg/kgを14週投与したところ末梢血HCVRNAが検出感度以下になったものが9例中1例、7mg/kgを14週投与した場合は9例中4例であり、主立った副作用は頭痛、発熱などあまり重篤なもののみならず、良好な成績をあげている¹⁴⁾。

2 エクソソームとは？

末梢血にエクソソームと呼ばれる細胞膜と同様に脂質膜構造をもった50～100nm程度の大きさの粒子が存在する。エクソソームは多くの細胞から分泌され、血液、唾液、尿、乳汁、精液などに存在している。エクソソームは表面に特異的な抗原(CD9, CD63, CD83など)を有し、エクソソーム内にはサイトカイン、mRNA、miRNAなど機能的分子が含まれており、能動的に細胞外に放出され細胞間情報伝達に関与していると考えられている¹⁵⁾。例えば免疫担当細胞由来のエクソソームは元の細胞由来のmiRNA発現プロファイルをもっている¹⁶⁾。樹状細胞が産生するエクソソームは免疫担当細胞の機能を活性化させるが、癌細胞由来のエクソソームは免疫担当細胞の機能活性を抑制することが報告されている¹⁷⁾(図1)。さらにHIVなどのウイルス粒子を伝搬し感染拡大の役割を担っているなど¹⁸⁾、エクソソームは感染症、免疫応答に深く関与している事が示唆される。またエクソソームが関与する細胞間情報伝達様式は以下の3通りが考えられている；(1)エクソソーム表面にある抗原とその受容体を持った細胞

の間に特異的に行われる場合、(2)エクソソーム膜に存在する蛋白が細胞外に放出された際に切断され、蛋白の断片が可溶性のリガンドとして標的細胞の受容体と結合する場合、(3)エンドサイトーシスを利用した、非特異的な場合である¹⁹⁾(図2)。

3 肝疾患を診断する際の検体採取の問題点

肝組織中のmiRNA発現解析は非常に多くの情報をもたらす、疾患の診断など臨床的に有用である^{20～22)}。しかし肝組織の採取には患者に侵襲を与えるため反復の採取は難しいこと、病理組織診断の際には専門の病理医の診断が必要であり、病理医間の診断に差があるなど、簡便性に欠けることなどいくつかの問題点がある。近年肝疾患の診断は血液による検査、CT、腹部エコーなど画像診断が有効になってきたが、肝線維化の程度は病理組織診断が現在もゴールドスタンダードであること、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の診断は病理組織による概念であること、などの理由で確定診断を得るためには針生検にて肝組織を採取する必要がある。そのため検体採取の際に被検者にとってはストレスが少なく、解析者にとっては取り扱いが簡便である方法の確立が急務とされている。これらの流れに応じて末梢血を用いたmiRNAの発現解析を用いた慢性肝疾患の診断の試みを次項に述べる。

4 末梢血中のmiRNAを用いた肝疾患診断

血清または血漿中のmiRNAの発現解析を利用して癌の診断を行うことは多くの研究者によって試みられている²³⁾。また慢性肝疾患診断では慢性B型肝炎(CHB)、慢性C型

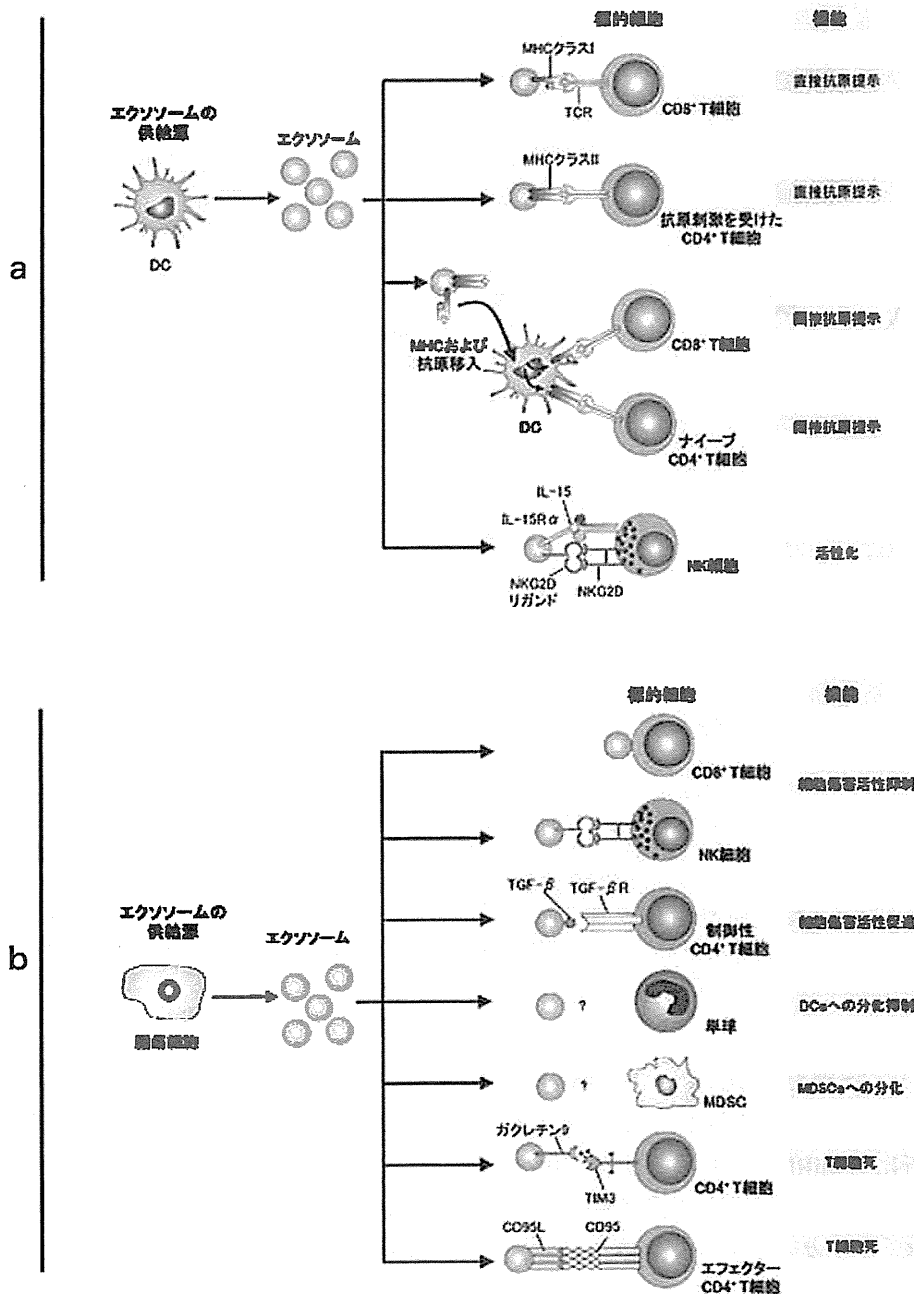


図1 エクソソーム供給細胞別による細胞間情報伝達様式の例

- 細胞から分泌されたエクソソームは、多くの免疫担当細胞の活性を亢進する場合。エクソソームの供給源が樹状細胞である場合、エクソソームを介して免疫担当細胞の機能を亢進する。
- 細胞から分泌されたエクソソームが免疫担当細胞の機能を抑制する場合。エクソソームの供給源が腫瘍細胞である場合、エクソソームを介して免疫担当細胞の機能を抑制する(文献17より改変し、引用)。

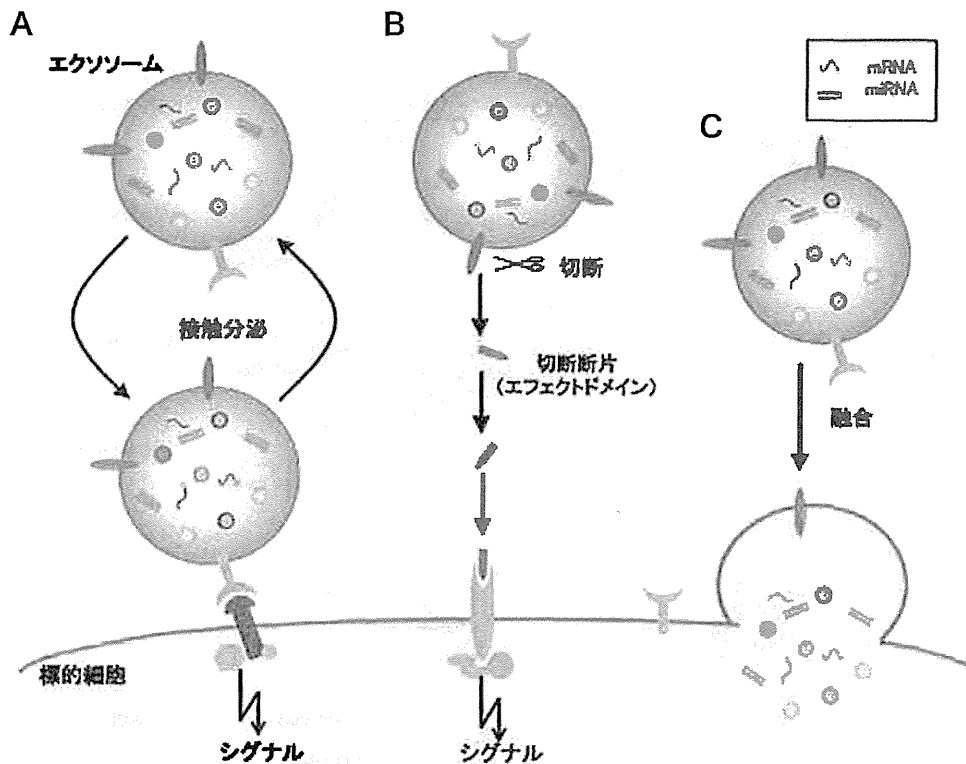


図2 エクソソームによる細胞間情報伝達の様式

- A. エクソソーム膜に存在する蛋白と標的細胞の持っている受容体と結合し情報伝達を行う。
- B. エクソソーム膜に存在する蛋白が細胞外に放出された際に切断される。切断された蛋白の断片が可溶性のリガンドとして標的細胞の受容体と結合し、情報伝達を行う。
- C. エクソソームの膜が標的細胞の膜と融合し、エクソソームの内部に含まれている分子(蛋白、メッセンジャー RNA、miRNAなど)が標的細胞に移行することによって情報伝達を行う(文献19より改変し、引用)。

肝炎(CHC)、肝細胞癌(HCC)、NASHの診断の試みが2010年頃から始まっている。また病態解析にもmiRNA発現解析は広く用いられており、慢性肝機能不全の急性増悪、薬剤性肝障害、インターフェロン治療結果の診断が行われている。以上の報告の中で判定に使用したmiRNAの中で最も使われたものはmiR-122であった。

5 エクソソーム中のmiRNAを使った慢性肝疾患診断

多くの解析では循環血中miRNAを用いた

慢性肝疾患の診断は血清または血漿を用いている。われわれは解析対象を末梢血中のエクソソーム中におけるmiRNAとした。その理由として(1)末梢血中には多くのRNA分解酵素が存在し、RNAが壊されやすい状態にあるがエクソソーム中のRNAはRNA分解酵素の影響を受けにくく存在が安定していること、(2)エクソソームは細胞間情報伝達を行うため、より病態によって含まれるmiRNAなどが変化していることが想定されること、以上のことよりエクソソームを解析対象にした方がより確実なバイオマーカーができる可

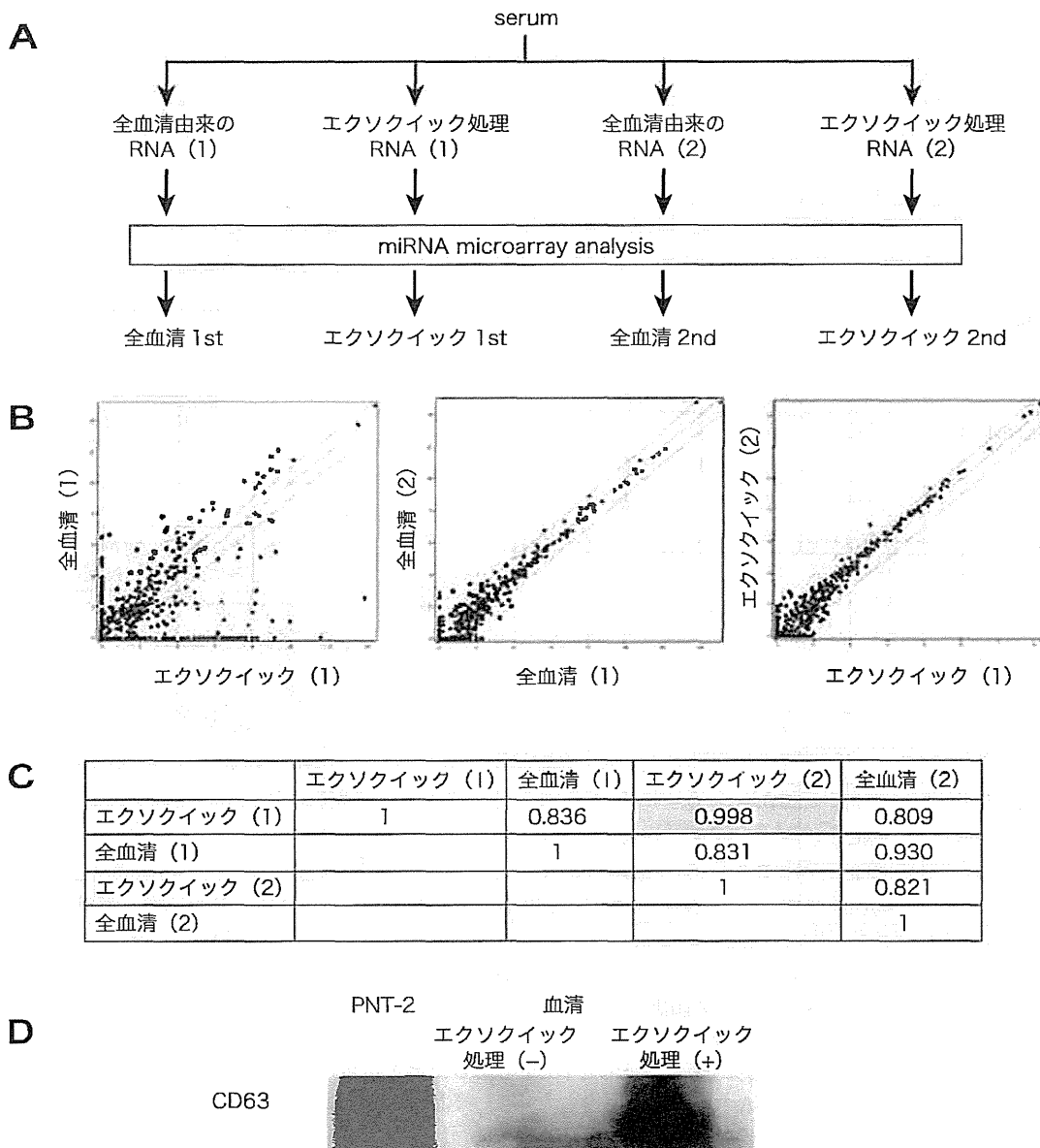


図3 再現性の得られるマイクロアレイ解析の方法

- 正常肝検体ボランティアより血液を採取し、それぞれ血清とエクソクイックを使った簡便なエクソソーム画分よりRNA抽出キット (miRNeasy Mini kit (Qiagen)) によって total RNA を抽出しマイクロアレイを用いて miRNA 解析を行った。
- 再現性の比較. 補正していない生データを用いて Scatter plot に描出した. 左は血清から得た miRNA 発現とエクソクイックから得た miRNA 発現の比較, 真ん中は1回目の血清から得た miRNA 発現と2回目の血清から得た miRNA 発現の比較, 右は1回目のエクソクイックから得た miRNA 発現と2回目のエクソクイックから得た miRNA 発現の比較. 赤の blot は発現の高い miRNA で黒の blot は発現の低い miRNA を示す.
- Pearson's pairwise による相関値
- CD63 抗体によるウエスタンブロット解析, PNT-2: (前立腺細胞株) を用いた超遠心法によるエクソソーム画分抽出液(古典的なエクソソーム回収方法), -EQ: ヒト血清, +EQ: エクソクイック処理をしたヒト血清(文献24より引用)

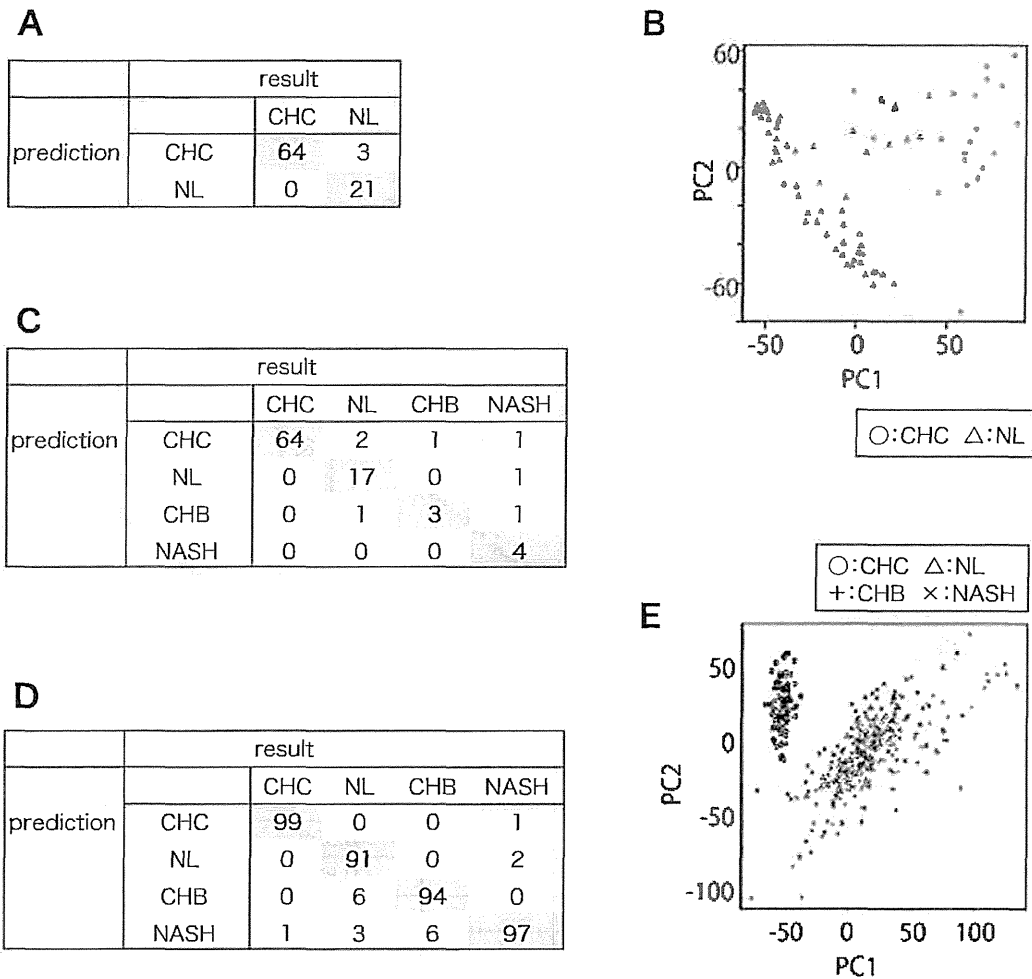


図4 エクソソーム中のmiRNAを用いた慢性肝疾患診断

- CHCとNLにおけるLOOCVによる両者の分類行が予想で列が現実(結果)を示す。
- CHCとNLの時のPCA(主成分分析)。CHCとNLを考慮したときに得られるPCAによる2次元の附置。規格化した発現パターンをPCAすることで得られた第1, 第2主成分得点を用いた(黒丸はCHC, 赤丸はNLを示す)。
- CHC, CHB, NASHの3種類の慢性肝疾患と正常肝の分別をLOOCVにて示す。
- CHB, NASHの症例数が少ないため, 年齢, 性別, BMIを加味した仮想患者集団を作成し, それをもとにした解析(in silico resampling)
- in silico resamplingをもとにした主成分分析。(文献24より引用)

能性があると考えた。しかしエクソソームの抽出は通常超遠心法によって行われるが, バイオマーカーとして使用するには煩雑な手順であるために, 患者血清より簡便にエクソソームを回収する方法としてエクソクイック®

(System Bioscience)を用いた。

まずエクソソーム解析が再現性のあるものであるか, エクソクイックがエクソソーム解析の簡便な使用となるかを検討した。同一人物(筆者)より4回採血を行い, 1回目の採

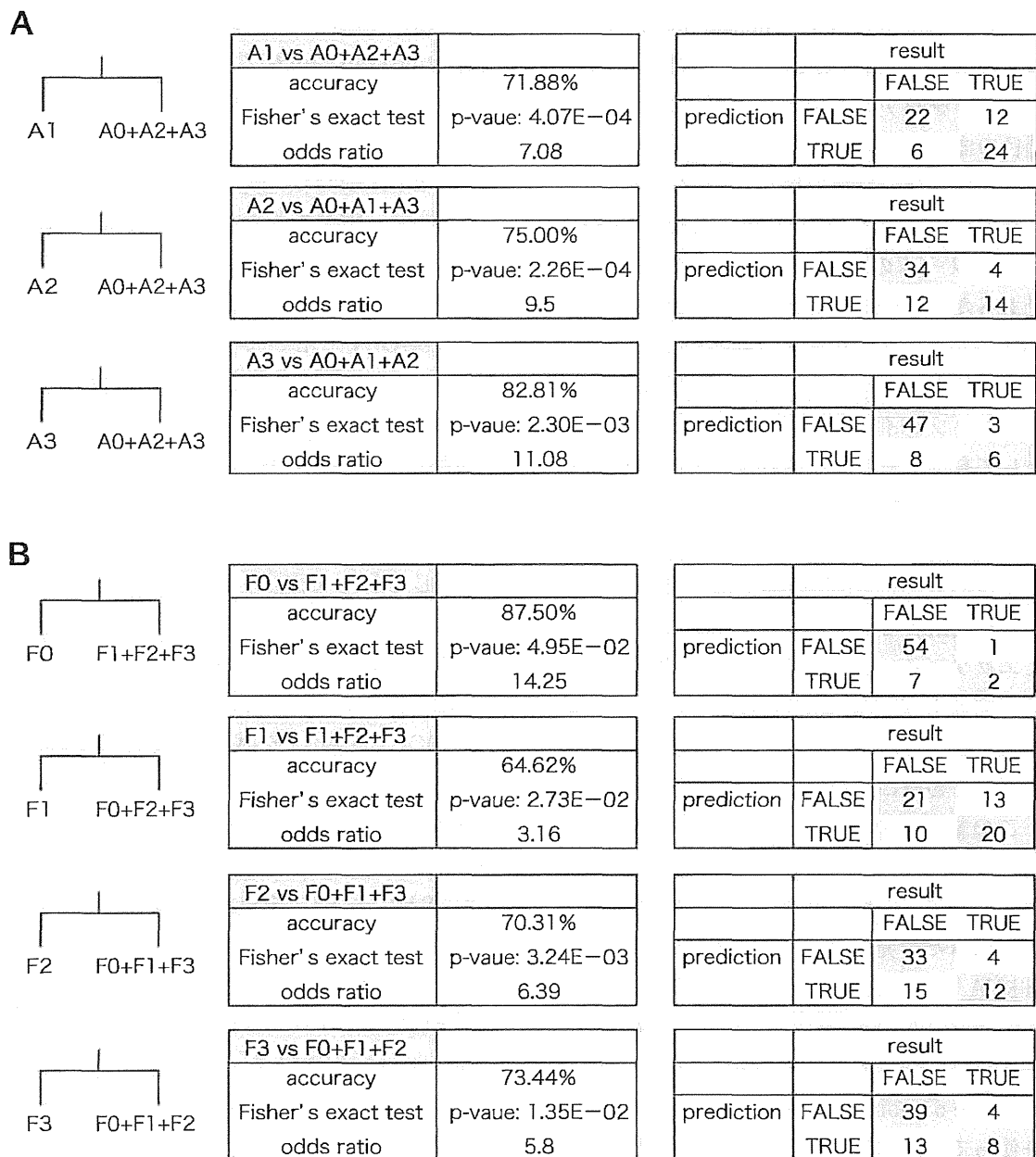


図5 エクソソームを用いた慢性肝疾患における肝の炎症と線維化の程度の診断

- A. 肝の炎症の程度をA1, A2, A3別に分別したもので、それぞれの分別に対し accuracy, p-値, odds比を示した。
 B. 肝の線維化の程度につき同様に線維化の程度の弱いものから F0, F1, F2, F3別に分別した。(文献24より引用)

血から血清を分離し total RNA を回収した、
 2回目の採血よりエクソクイックを使った簡
 便な方法でエクソソーム画分を回収し total

RNA を回収した、さらに3回目の採血から
 血清、4回目の採血からエクソクイックとい
 うように合計4検体に対しマイクロアレイ

(Agilent human miRNA microarray Rel 14.0)にてmiRNA発現解析を行った(図3A)。4検体のマイクロアレイ解析を比較したところ1回目の血清を使用した場合と2回目の血清を使用した場合の発現の相関は0.930であった、また血清とエクソソームでの比較は0.836、エクソソームの2回の解析の比較では0.998であった(Pearson's pairwise correlation)ことより、エクソソームを解析対象にした場合が最もmiRNAの再現性がよかった(図3B, C)。次にエクソクイック利用はエクソソーム解析として有用であるかを確認するために従来の超遠心法で採取したエクソソームとエクソクイックで採取した場合を比較した。エクソソームの表面にCD63抗原が表出されていることを利用して、ウエスタンブロットによってエクソクイックで採取したものはCD63が強く発現していることがわかり、エクソクイックは十分にエクソソームを濃縮した状態で回収できることがわかった(図3D)²⁴⁾。

この結果を踏まえてエクソソーム画分を使った慢性肝炎の診断を試みた。正常肝(NL) 24例、慢性C型肝炎(CHC) 64例の分別を試みた。発現パターンの異なった9種のmiRNA(miR-320c, miR-451, miR-638, miR-762, miR-1207-5p, miR-1225-5p, miR-1246, miR-1275, miR-1914)の発現パターンを用いてLeave-one-out cross-validation (LOOCV)を使ってNLとCHCを分別したところ96.6%のaccuracyが得られた(図4A)。miRNA発現パターンを2つの主成分に分け(PC1とPC2)CHCとNLを視覚的に分別できるようにした(図4B)。それをさらにNLとCHCに加えて慢性B型肝炎(CHB) 4例、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH) 12例を用い四疾患の分別を試みた。12種のmiRNA(miR-320c, miR-451, miR-486-5p, miR-630, miR-638,

miR-720, miR-762, miR-1207-5p, miR-1225-5p, miR-1246, miR-1275, miR-1974)の発現パターンを用いてLOOCVを行ったところ88.35%の分別能が得られた(図4C)。しかしCHBとNASHは解析症例数が少ないため年齢、性別、BMIをもとに各々の疾患群を100例になるように仮想患者集団を作成した(in silico resampling)。in silico resamplingをもとにLOOCVを用いて4群間分別を行い(図4D)、また4群間における主成分分析を行った(図4E)。

慢性C型肝炎の炎症と線維化程度についての解析を行った。Metavirの評価スコア²⁴⁾で肝生検組織の肝の炎症と線維化の評価をあらかじめ行っておき、miRNAの発現パターンを用いてそれぞれの程度の分別を行った。肝の炎症はA0が1例であったためA0の解析は省略した、A1とA0+A2+A3の分別についてLOOCVを用いて試みた場合のaccuracyは71.88%、odds比は7.08であった。A2とA0+A1+A3の分類とA3とA0+A1+A2の分類はそれぞれaccuracyが75.00%、82.81%、odds比は9.50、11.08であった(A0は検体数が一例のみであったため解析を行っていない)(図5A)。線維化についてF0とF1+F2+F3について分別を試みたところaccuracyは89.06%、odd ratioは16.71であった。F1、F2、F3それぞれを全体から分別抽出するaccuracyは67.19%、73.40%、73.40%であった。またそれらのodds比はそれぞれ4.12、7.77、7.84であった(図5B)。

6 おわりに

肝疾患においてmiRNA発現解析はバイオマーカーとして有用であることを示した。現在血液マーカーや画像診断を組み合わせて診断している慢性肝疾患の診断や、病理組織で

表1 末梢血由来miRNAを用いた慢性肝炎患診断例

解析規模	分別に必要な miRNA	解析方法	解析対象	参考文献
正常肝:160, 無症候性B型慢性肝炎:55, B型慢性肝炎:80, 肝細胞癌:65, C型慢性肝炎:48	miR-10a, miR-125b, miR-92a, miR-23b, miR-23a	リアルタイム qPCR	血清	Li LM et al : Cancer Res. 2010
正常肝:40, B型慢性肝炎:83, 肝疾患以外で起こる肝障害:15	miR-122	リアルタイム qPCR	血漿	Zhang Y et al : Clin Chem. 2010
正常肝:19, C型慢性肝炎:62, 肝細胞癌:29	miR-21	リアルタイム qPCR	血清	Bihere V et al : PLoS ONE 2011
正常肝:19, C型慢性肝炎:68	miR-122	リアルタイム qPCR	血清	Bihrer V et al : Am J Gastroenterol 2011
正常肝:19, C型慢性肝炎:18, 非アルコール性脂肪肝:34	miR-122, miR-34a, miR-16	リアルタイム qPCR	血清	Cermelli S et al : PLoS ONE 2011
正常肝:80, B型慢性肝炎:80	miR-122	リアルタイム qPCR	血清	Chen Y et al : FASEB J 2011
正常肝:37, 無症候性B型慢性肝炎:77, B型慢性肝炎:101, 慢性肝炎急性増悪:135	miR-122, miR-194, miR-20a, miR-106a, let-7b, miR-19b, miR-223, miR-16, miR-92a	マイクロアレイ	血清	Ji F et al : J Viral Hepatitis 2011
正常肝:20, 肝細胞癌:46	miR-21, miR-221, miR-222, miR-224	リアルタイム qPCR	血清	Li J et al : Biochem Biophys Res Commun. 2011
正常肝:34, B型慢性肝炎:48, 肝細胞癌:70	miR-122, miR-222, miR-223	リアルタイム qPCR	血清	Qi P et al : PLoS ONE 2011
正常肝:71, 肝疾患以外で起こる肝障害:107, 肝細胞癌:105	miR-16, miR-195, miR-199a	リアルタイム qPCR	血清	Qu KZ et al : J Clin Gastroenterol. 2011
正常肝:25, 薬剤性急性肝障害:53	miR-122, miR-192, miR-1, miR-218	リアルタイム qPCR	血清と血漿	Starkey Lewis PJ et al : Hepatology 2011
正常肝:19, B型慢性肝炎:89	miR-122	リアルタイム qPCR	血清	Waidmann O et al : J Viral Hepatitis 2012
正常肝:167, B型慢性肝炎:169, 肝硬変:141, 肝細胞癌:457	miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, miR-801	リアルタイム qPCR	血漿	Zhou J et al : J Clin Oncol 2011
正常肝:17, 肝硬変:61	miR-513-3p, miR-571, miR-652	マイクロアレイ	血漿	Roderburg C et al : PLoS ONE 2012
正常肝:17, 肝硬変:22	miR-181a, miR-181b	リアルタイム qPCR	血清	Wang B et al : Biochem Biophys Res Commun 2012
正常肝:57, B型慢性肝炎:52	miR-26a, miR-221, miR-22*	リアルタイム qPCR	血清	Zhu HT et al : Mol Biotechnol 2012
正常肝:24, C型慢性肝炎:95, B型慢性肝炎:16, 非アルコール性脂肪性肝炎:20	miR-1225-5p, miR-1275, miR-638, miR-762, miR-320c, miR-451, miR-1974, miR-630, miR-1207-5p, miR-720	マイクロアレイ	エクソソーム	Murakami Y et al : PLoS ONE 2012
正常肝:24, C型慢性肝炎:102, SVR:23	miR-122, miR-192	リアルタイム qPCR	血清	van der Meer AJ et al : J Viral Hepat. 2013
正常肝:22, B型慢性肝炎:198	miR-122, miR-22	リアルタイム qPCR	血清	Arataki K et al : J Med Virol 2013
正常肝:22, 非C慢性肝炎:20, C型慢性肝炎:44	miR-92a, miR-20	リアルタイム qPCR	血清と血漿	Shrivastava S et al : Hepatology 2013

SVR,sustained viral response for CHC after viral treatment

しか正確な評価ができない肝線維化診断についても適切なmiRNAの発現パターンを組み合わせることで正確な診断ができる可能性について示した。これらをバイオマーカーとして使用する際には大規模な解析による再現性の確認, 検査費用をいかに低く抑えるか, など克服すべき問題がある。現在慢性肝疾患使用されている血液マーカーや画像診断と組み合わせることによってより正確な診断や, 患者それぞれの臨床状態に応じ, 治療法などを選択するなどの利用が今後期待される。

文 献

- 1) Ambros V : The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 : 350–355, 2004
- 2) Landgraf P, Rusu M, Sheridan R et al : A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401–1414, 2007
- 3) Esau C, Davis S, Murray SF et al : miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3 : 87–98, 2006
- 4) Hsu SH, Wang B, Kota J et al : Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 122 : 2871–2883, 2012
- 5) Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS et al : MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 122 : 2884–2897, 2012
- 6) Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE et al : Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* 23 : 1313–1326, 2009
- 7) Cheung O, Puri P, Eicken C et al : Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 48 : 1810–1820, 2008
- 8) Wang S, Qiu L, Yan X et al : Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G (1) -modulated P53 activity. *Hepatology* 55 : 730–741, 2012
- 9) Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A et al : Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327 : 198–201, 2009
- 9) Jopling CL, Yi M, Lancaster AM et al : Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309 : 1577–1581, 2005
- 10) Henke JI, Goergen D, Zheng J et al : microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27 : 3300–3310, 2008
- 11) Norman KL, Sarnow P : Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and the isoprenoid biosynthesis pathway by microRNA miR-122 involves distinct mechanisms. *J Virol* 84 : 666–670, 2010
- 12) Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM : Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 : 3193–3198, 2011
- 14) Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ et al : Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N Engl J Med* 368 : 1685–1694, 2013
- 15) Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW : Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8 : 4083–4099, 2008
- 16) Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C et al : Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2 : 282, 2011
- 17) Théry C, Ostrowski M, Segura E : Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9 : 581–593, 2009
- 18) Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gómez M, Erkizia I et al : HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6 : e1000740, 2010
- 19) Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ : Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73 : 1907–1920, 2010
- 20) Mott JL : MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: implications for hepatobiliary neoplasia. *Hepatology* 50 : 630–637, 2009
- 21) Kerr TA, Korenblat KM, Davidson NO : MicroRNAs and liver disease. *Transl Res* 157 : 241–252, 2011
- 22) Wang XW, Heegaard NH Orum H : MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology* 142 : 1431–

1443, 2012
23) Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T : Circulating
microRNA in body fluid: a new potential
biomarker for cancer diagnosis and prognosis.
Cancer Sci 101 : 2087-2092, 2010

24) Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T et al :
Comprehensive miRNA expression analysis in
peripheral blood can diagnose liver disease. PLoS
One 7 : e48366, 2012

* * *

解剖学



肝星細胞研究の変遷とその成果

肝星細胞は、Disse腔内に存在すると言われるが、この星細胞は1956年に群馬大学・故伊東俊夫名誉教授が発見した脂肪摂取細胞と同一のものと理解してよいのか。肝星細胞は、肝の線維化などに関与していると言われるが、現在どの程度まで研究が進み、解明されてきているか。大阪市立大学機能細胞形態学・池田一雄教授に、
(千葉県 O)



19世紀に記載されて以来、研究者が様々に報告してきた「肝星細胞」の名称は現在、国際的に統一されている。肝線維化に際して星細胞は活性化状態となり、各種 mediator を産生して線維成分の蓄積や炎症の進展に関与する

肝星細胞研究の紆余曲折

1876年、ドイツの解剖学者である von Kupffer は、塩化金法で染色される星状の細胞が肝小葉内の類洞周囲に数多く散在していることを発見し、“Sternzellen”(星細胞)と命名した。その後 Kupffer は、1898年の第12回ドイツ解剖学会において、家兎に墨を静注した標本を供覧し、肝類洞に存在する「特殊な内皮細胞」に墨が取り込まれると報告した。そして、この細胞が自身の発見した「星細胞」であると結論し、「類洞周囲の結合織細胞」であるとした以前の見解を是正した。この墨を貪食する細胞は今日、肝常在型マクロファージである Kupffer 細胞として知られているが、Kupffer は自らが発見した「星細胞」と「Kupffer 細胞」を混同したことになる¹⁾。

Kupffer の錯誤によって「類洞周囲の結合織細胞」は存在が否定されてしまったが、20世紀に入り様々な研究者によって、類洞周囲に「未知」の細胞が存在することが報告されるようになった。我が国においても群馬大学の伊東俊夫が、脂肪滴を持つ類洞周囲細胞を「脂肪摂取細胞」と命名し報告した。また、大阪市立大学の鈴木清は、Kupffer が最初に報告した「星細胞」に類似した細胞を鍍銀法によって染色し、門下の和氣健二郎が Kupffer の

塩化金法を追試し確立した。さらに和氣は、伊東をはじめとする多くの研究者の報告を追試し、彼らが報告した「類洞周囲の結合織細胞」はすべて同一のものであることを明らかにした²⁾。

以上の経緯により、この細胞には多くの名称が付されていたが、1996年に Hepatology 誌上にて“hepatic stellate cell”(肝星細胞)に統一することが提唱され、今日、国際的にはこの名称が定着している³⁾⁴⁾。

肝星細胞の生理的機能と肝病態下での役割

肝星細胞は類洞周囲腔(Disse腔)において類洞内皮に密接して存在し、肝細胞に多数の突起を伸ばしており、類洞構造を支持する役割を担っていると考えられている¹⁾。そして、Disse腔に存在する細胞外基質(extracellular matrix; ECM)の産生と分解を司る。星細胞はまた、ビタミンAを主成分とする多くの脂肪滴を有する(図1)。これは内臓系の線維芽細胞に共通した性質であるが、哺乳類では肝星細胞にほとんどが貯蔵され、ほかの臓器の線維芽細胞には貯蔵されない⁵⁾。

慢性の肝障害により星細胞は活性化を受け、筋線維芽細胞様に形質転換する⁴⁾⁶⁾。活性化星細胞では線維性コラーゲンを主体とするECM