




学位論文審査の結果の要旨

平成30年2月13日

審査委員	主査	村尾 孝児 		
	副主査	門脇 則光 		
	副主査	舩形 尚 		
願出者	専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
	学籍番号	10D737	氏名	坂本 鉄平
論文題目	Identification of microRNA profiles associated with refractory primary biliary cirrhosis			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			
<p>[要 旨]</p> <p>【目的】非コード領域のRNA分子であるmicro RNA(miRNA)は特定のmRNAの5'末端に結合しそのmRNAを分解する。その機能によりmiRNAは増殖、分化、アポトーシスおよび細胞生存に関与している。原発性胆汁性胆管炎(PBC)は原因が特定されていない慢性的な胆管障害である。PBC患者の1/3は治療に対する反応性が悪く予後が不良であることが示されている。現在までのところmiRNAと難治性PBCとの関係は明らかではなく検討を行った。</p> <p>【方法】PBC患者20例をPBCの治療薬(ウルソデオキシコール酸、ベサフィブラート)によって治療効果のあった治療効果群15例、治療に抵抗性がみられた治療抵抗群5例に分け、治療効果に起因する血清miRNAを1769分子が搭載されたアレイを用いて解析した。</p> <p>【結果】治療効果群と治療抵抗群を比較し治療開始後の血清において35分子のmiRNAが有意に上昇し、23分子が有意に下降していた。また、治療有効群と治療抵抗群ではmiRNAの異なるクラスター形成が認められた。この治療効果群と抵抗群で変化したmiRNAと臨床的パラメーターの関係を検討した。直接ビリルビン、AST、ALTの上昇はmiRNA-122の上昇と相関していた。また、AST、ALT、γGTPはmiRNA-378fの上昇と相関していた。一方、miRNA-4311の下降はASTとALTの下降に関係していた。さらにmiRNA-4714-3pと総ビリルビン、LDHの関係は負の相関を示していた。</p> <p>【結語】miRNAのプロファイルを決定することはPBC進展の特徴描写に役立つ1つの方法であり、将来的に治療抵抗性のPBC患者を予測するバイオマーカーとなり得る可能性がある。</p>				

本研究に関する学位論文審査委員会は平成30年1月31日に行われた。

本研究は原発性胆汁性肝硬変(原発性胆汁性胆管炎)に関して、miRNAが治療抵抗性を予測するバイオマーカーになり得ることを指摘したもので、結果に対する十分な考察もなされている。本研究で得られた成果はPBCにおける薬物治療の有効群と無効群でのmiRNAの差異を明らかにしmiRNAが治療抵抗性に関与している可能性を示唆している点で意義があり、学術的価値が高い。委員会の合議により、本論文は博士(医学)の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては

1. 血清は治療開始前のものか治療抵抗性が確認された時点のものか。

血清は全て治療開始後のものである。治療歴は半年から18年と幅があり治療抵抗性と確認された時点の血清ではなく、同時期に採血された血清を使用している。

2. miRNAは治療が入った状態で変化するのか。

検索し得た限りではPBC患者に関して治療前後のmiRNAを比較した報告は認められなかった。一例としてラットではアセトアミノフェン投与によるmiRNA変化[1]が報告されており、ヒトに対する薬物治療においてもmiRNAは変動すると考えられる。

3. 治療抵抗性の機序に関するmiRNAをみているのか。

さまざまな疾患においてmiRNAと治療抵抗性の関連を示唆する報告がある。一例としてmiRNAが薬物トランスポーター関連タンパク質を調節することによって癌における薬剤耐性に重要な役割をはたしていることが報告されている[2]。本研究において変動がみられたmiRNAが治療抵抗性の機序に関連している可能性は考えられる。

4. 細胞周期やがん抑制遺伝子が原発性胆汁性胆管炎と関連することはこれまでに知られているのか。

miRNA-506が胆管細胞において細胞増殖を障害することが報告されている[3]。また、原発性胆汁性胆管炎患者の胆管上皮細胞においてWAF1およびp53の発現亢進がみられることが報告されている[4]。本研究での治療効果群と治療抵抗群におけるmiRNA発現の比較ではmiRNA-506には有意差のある変動は認められなかった。miRNA-506はPBC発症機序に関連している可能性が示唆[5]されており、ウルソデオキシコール酸やベザフィブラートでは機序に影響を与えての治療効果は得られない可能性が考えられる。しかし、PBCと細胞周期やがん抑制遺伝子との関連を示唆する報告はあることから、本研究で治療効果群と治療抵抗群で変動が認められたmiRNAが治療抵抗性のバイオマーカーや治療抵抗性に関与している可能性が考えられる。

5. AFP値とγGTP値のカットオフ値の根拠。

治療効果判定のモデルとしてはいくつか報告があり、それぞれ有用性が報告されている[6]。反応良好：血清ALP、ALT、IgM値が治療開始後2年以内に正常化/反応普通：血清ALP、ALT、IgM値が治療開始後2年経過した時点で正常上限の1.5倍以下/反応不良：血清ALP、ALT、IgM値が治療開始後2年経過した時点で正常上限の1.5倍以上[7]、ALP値 $<1.76 \times$ 正常上限[8]といった報告例を参考にカットオフ値を決定した。

問)治療効果群と治療抵抗群の境界に近いような患者が入っている可能性

治療効果判定モデルによって観察期間は様々である。判定までの観察期間を1~2年としているものが多く[7, 8, 9]、治療半年後に評価を行った本研究では他のモデルでは治療抵抗群に組み入れられるべき症例が混在する可能性は否定できない。しかし、今回の治療抵抗群5例の治療期間は2年から16年であり、治療効果群と治療抵抗群の区別をつけられていると考える。

6. miRNAの供給源。肝細胞のように記載されているが、胆管上皮が障害を受けるのであれば胆管細胞がmiRNAの供給源ではないのか。

本研究ではmiR-122においても治療効果群と治療抵抗群で発現に有意差を認めている。miR-122

は肝実質細胞(肝細胞)に特異的なmiRNAとされており[10]、肝臓に何らかの障害が起こった際に肝細胞の脱落とともに血液中に放出され、血清中で高く検出される可能性がある。しかし、miR-122は肝臓において分化や増殖の他、様々な役割を果たしているため[11]、放出されたmiRNAが胆管の細胞増殖に影響を及ぼしている可能性は考えられる。胆管結紮モデルマウス肝臓のmiRNA解析から、miR-199a-5pが肝内胆管の増殖に関与している可能性[12]を指摘されており、PBCにおいても胆管由来のmiRNAが病態に関与している可能性が考えられる。

7. 自己免疫性肝炎(AIH)や原発性硬化性胆管炎(PBC)のmiRNA発現に関する報告。

AIHに関しては血清中のmiR-21およびmiR-122の発現レベルをAIH患者、慢性C型肝炎患者および健常者において比較検討した研究[13]があり、これらの血清miRNAがAIHの潜在的なバイオマーカーでありAIH病因に関与している可能性があると報告している。PSCについてはPSC患者、胆管癌患者、健常者を対象とした研究[14]でmiRNAがPSCおよび胆管癌患者の診断におけるバイオマーカーになる可能性を報告している。

8. PBCにおいてベザフィブラートがターゲットとする機序。

ベザフィブラートはperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α の外因性リガンドである。加えてpregnane X receptor (PXR)のリガンドでもあり、PPARsとPXRがともに活性化された際には、疎水性胆汁酸の親水化や胆汁酸合成の抑制により胆汁うっ滞改善効果が得られる[15]と報告されている。

9. 肝生検を用いずmiRNAの組み合わせでPBCの診断ができるようになりうるか

現在のPBC診断基準として「組織学的検索の機会はないが、抗ミトコンドリア抗体(AMA)が陽性で、しかも臨床像及び経過からPBCと考えられるもの」という基準がある[16]。しかしAMA陰性PBCなど非定型例の診断と鑑別には肝生検が不可欠な状況である。miRNAの活用により非定型例によらず肝生検を行わずとも診断が可能になる症例が増加することは期待できる。

[1] T. Fukushima, Y. Hamada, H. Yamada, I. Horii, Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride — Regulating role of micro-RNA for RNA expression. *J Toxicol Sci*, 32 (2007), pp. 401-409

[2] J. Ma, C. Dong, and C. Ji, MicroRNA and drug resistance, *Cancer Gene Therapy*, vol. 17, no. 8, pp. 523-531, 2010.

[3] Banales JM, et al. MiRNA-506 promotes primary biliary cholangitis-like features in cholangiocytes and immune activation. *Hepatology*, 2017 Sep 18

[4] Harada K, Furubo S, Ozaki S, Hiramatsu K, Sudo Y, Nakanuma Y, Increased expression of WAF1 in intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis relates to apoptosis. *J Hepatol* 34:500-506

[5] Banales JM, et al. Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2012 Aug; 56(2):687-97.

[6] Zhang LN, et al : Early biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis of primary biliary cirrhosis : results of a 14-year cohort study. *Hepatology* 58 : 264—272, 2013.

[7] 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 平成22年度報告書, 2011.3

[8] Kumagi T, et al : Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol 105 : 2186-2194, 2010

[9] Pares A, et al : Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. Gastroenterology 130 : 715—720, 2006.

[10] Landgraf, P. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell 129, 1401-1414 (2007)

[11] Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122—a key factor and therapeutic target in liver disease. J Hepatol. 2015;62:448-57.

[12] Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y et al. Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. Hepatogastroenterology 2010; 57: 1013-23.

[13] Migita K, Komori A, Kozuru H et al. Circulating microRNA profiles in patients with type-1 autoimmune hepatitis. PloS One. 2015; 10

[14] Bernuzzi F, Marabita F, Lleo A, et al. Serum micrornas as novel biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. Clin Exp Immunol. 2016;185:61-71.

[15] Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, et al. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. Hepatology. 2013;57(5):1931-41.

[16]厚生労働省難治性疾患政策研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 原発性胆汁性胆管炎（PBC）診療ガイドライン（2017年）

などについて多数の質問が行われた。申請者はいずれにも明確に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲 載 誌 名	MOLECULAR MEDICINE REPORTS 第14巻, 第4号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2016年10月	出版社(等)名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は, 1, 500字以内にまとめてください。