

Title	肝線維化指標となる細胞外miRNAの機能解析
Sub Title	Functional analysis of extracellular miRNAs as indicators of liver fibrosis
Author	松崎, 潤太郎(Matsuzaki, Juntaro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>肝硬変はウイルス性肝炎や脂肪性肝炎などが慢性的に持続することによって肝臓が線維化した進行性・致死性の疾患であり、肝細胞癌の発生源地でもあり、世界で年間に130万人がこの疾患が原因で死亡している (Lancet Gastroenterol Hepatol 5:245, 2020)。世界的な肥満率の上昇に伴って肝硬変治療の市場規模も上昇を続けており、2026年には3兆円に達すると見込まれる(Coherent Market Insights, 2021)が、現在、肝硬変を回復させる有効な治療法は存在しない。申請者は、日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業「原発性胆汁性胆管炎に対する抗線維化治療薬の開発」(研究代表者: 都立駒込病院 木村公則)の支援のもとで実施された医師主導治験に参画した。この治験では、肝硬変患者に対してCBP/<math>\beta</math>-catenin阻害薬 (PRI-724)を投与し、被験者の約半数に肝線維化改善効果が見られることが明らかになった (EBioMedicine 80:104069, 2022)。一方、細胞外小胞に包含されたmiRNAは、細胞間コミュニケーションツールとしての役割を持ち、次世代のバイオマーカーや核酸医薬の標的として注目されている。そこでPRI-724を投与された肝硬変患者より、投与前後の血漿を収集しPSアフィニティー法により細胞外小胞を分離精製し (Sci Rep 6:33935, 2016)、高感度マイクロアレイによってmiRNAの網羅的定量を行った。結果、PRI-724有効性を反映する血中miR-Xを同定した。PRI-724投与前後でのヒト肝臓組織標本を用いてin situ hybridizationを実施し、miR-Xが肝細胞内で発現していることが判明した。さらに肝細胞から分泌されるmiR-Xの機能を明らかにするため、in vitroで初代培養した肝星細胞にmiR-Xのmimicをトランスフェクションしたところ、肝星細胞の活性化マーカーである<math>\alpha</math>SMAの発現上昇を引き起こした。このことからmiR-Xは肝線維化を促進させるmiRNAであると考えられ、さらにヒト肝臓組織内miR-887-3p発現量はPRI-724投与後に低下していたことから、PRI-724の肝線維化改善作用の一端を説明する重要なmiRNAであることが明らかになった。</p> <p>Liver cirrhosis (LC) is a progressive and fatal disease due to the fibrosis of the liver induced by chronic viral or steatohepatitis. LC is a major cause of hepatocellular carcinoma, leading 1.3 million deaths annually worldwide (Lancet Gastroenterol Hepatol 5:245, 2020). The market size of LC treatment continues to rise with the rise in global obesity rates and is expected to reach 3 trillion yen by 2026 (Coherent Market Insights, 2021). However, there is no effective treatment to restore liver cirrhosis. The applicant participated in a physician-led clinical trial supported by Japan Agency for Medical Research and Development, entitled "Development of Anti-Fibrosis Treatment for Primary Biliary Cholangitis" (Principal Investigator: Kiminori Kimura, Komagome Metropolitan Hospital). In this trial, a CBP/<math>\beta</math>-catenin inhibitor (PRI-724) was administered to patients with LC, and a half of the participants showed improvement in liver fibrosis (EBioMedicine 80:104069, 2022). On the other hand, miRNAs encapsulated in extracellular vesicles (EVs) have a role as intercellular communication tools and are attracting attention as next-generation biomarkers and targets for nucleic acid medicine. Therefore, we collected plasma from LC patients treated with PRI-724 before and after administration, isolated and purified EVs by the PS affinity method (Sci Rep 6:33935, 2016), and comprehensively quantified miRNAs by a highly sensitive microarray. As a result, we identified miR-X in plasma reflecting PRI-724 efficacy. In situ hybridization was performed on human liver tissue samples before and after PRI-724 administration, and miR-X was found to be expressed in hepatocytes. To further elucidate the function of miR-X secreted from hepatocytes, we transfected miR-X mimic in primary cultured hepatic stellate cells in vitro. We found that miR-X mimic increased the mRNA expression of <math>\alpha</math>SMA, an activation marker of hepatic stellate cells. This suggests that miR-X has a pro-fibrotic role. Furthermore, miR-887-3p expression in human liver tissue was decreased after PRI-724 treatment, indicating that miR-X is an important miRNA that may explain part of the anti-fibrotic effect of PRI-724.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220248">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220248</a>

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	准教授	補助額	300 (A) 千円
	氏名	松崎 潤太郎	氏名 (英語)	Juntaro Matsuzaki		
研究課題 (日本語)						
肝線維化指標となる細胞外 miRNA の機能解析						
研究課題 (英訳)						
Functional analysis of extracellular miRNAs as indicators of liver fibrosis						
1. 研究成果実績の概要						
<p>肝硬変はウイルス性肝炎や脂肪性肝炎などが慢性的に持続することによって肝臓が線維化した進行性・致死性の疾患であり、肝細胞癌の発生母地でもあり、世界で年間に130万人がこの疾患が原因で死亡している (Lancet Gastroenterol Hepatol 5:245, 2020)。世界的な肥満率の上昇に伴って肝硬変治療の市場規模も上昇を続けており、2026年には3兆円に達すると見込まれる (Coherent Market Insights, 2021)が、現在、肝硬変を回復させる有効な治療法は存在しない。申請者は、日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業「原発性胆汁性胆管炎に対する抗線維化治療薬の開発」(研究代表者:都立駒込病院 木村公則)の支援のもとで実施された医師主導治験に参画した。この治験では、肝硬変患者に対してCBP/<math>\beta</math>-catenin阻害薬(PRI-724)を投与し、被験者の約半数に肝線維化改善効果が見られることが明らかになった (EBioMedicine 80:104069, 2022)。一方、細胞外小胞に含まれたmiRNAは、細胞間コミュニケーションツールとしての役割を持ち、次世代のバイオマーカーや核酸医薬の標的として注目されている。そこでPRI-724を投与された肝硬変患者より、投与前後の血漿を収集しPSアフィニティー法により細胞外小胞を分離精製し (Sci Rep 6:33935, 2016)、高感度マイクロアレイによってmiRNAの網羅的定量を行った。結果、PRI-724有効性を反映する血中miR-Xを同定した。PRI-724投与前後のヒト肝臓組織標本を用いてin situ hybridizationを実施し、miR-Xが肝細胞内で発現していることが判明した。さらに肝細胞から分泌されるmiR-Xの機能を明らかにするため、in vitroで初代培養した肝星細胞にmiR-Xのmimicをトランスフェクションしたところ、肝星細胞の活性化マーカーである<math>\alpha</math>SMAの発現上昇を引き起こした。このことからmiR-Xは肝線維化を促進させるmiRNAであると考えられ、さらにヒト肝臓組織内miR-887-3p発現量はPRI-724投与後に低下していたことから、PRI-724の肝線維化改善作用の一端を説明する重要なmiRNAであることが明らかになった。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Liver cirrhosis (LC) is a progressive and fatal disease due to the fibrosis of the liver induced by chronic viral or steatohepatitis. LC is a major cause of hepatocellular carcinoma, leading 1.3 million deaths annually worldwide (Lancet Gastroenterol Hepatol 5:245, 2020). The market size of LC treatment continues to rise with the rise in global obesity rates and is expected to reach 3 trillion yen by 2026 (Coherent Market Insights, 2021). However, there is no effective treatment to restore liver cirrhosis. The applicant participated in a physician-led clinical trial supported by Japan Agency for Medical Research and Development, entitled "Development of Anti-Fibrosis Treatment for Primary Biliary Cholangitis" (Principal Investigator: Kiminori Kimura, Komagome Metropolitan Hospital). In this trial, a CBP/<math>\beta</math>-catenin inhibitor (PRI-724) was administered to patients with LC, and a half of the participants showed improvement in liver fibrosis (EBioMedicine 80:104069, 2022). On the other hand, miRNAs encapsulated in extracellular vesicles (EVs) have a role as intercellular communication tools and are attracting attention as next-generation biomarkers and targets for nucleic acid medicine. Therefore, we collected plasma from LC patients treated with PRI-724 before and after administration, isolated and purified EVs by the PS affinity method (Sci Rep 6:33935, 2016), and comprehensively quantified miRNAs by a highly sensitive microarray. As a result, we identified miR-X in plasma reflecting PRI-724 efficacy. In situ hybridization was performed on human liver tissue samples before and after PRI-724 administration, and miR-X was found to be expressed in hepatocytes. To further elucidate the function of miR-X secreted from hepatocytes, we transfected miR-X mimic in primary cultured hepatic stellate cells in vitro. We found that miR-X mimic increased the mRNA expression of <math>\alpha</math>SMA, an activation marker of hepatic stellate cells. This suggests that miR-X has a pro-fibrotic role. Furthermore, miR-887-3p expression in human liver tissue was decreased after PRI-724 treatment, indicating that miR-X is an important miRNA that may explain part of the anti-fibrotic effect of PRI-724.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
山口智子、松崎 潤太郎、落谷 孝広	Engineering of human liver progenitor-like cells for a new exosomal therapy of liver fibrosis	第30回日本消化器関連学会週間・International Session (Symposium 2)	2022年10月28日			