

# 中鋪 卓 論文内容の要旨

## 主 論 文

### Bile extracellular vesicles from end-stage liver disease patients show altered microRNA content

末期肝不全患者において胆汁中細胞外小胞の内包 microRNA は変化する

中鋪 卓、三馬 聡、三嶋 博之、増本 博司、日高 匡章、曾山 明彦、  
神田 泰子、福島 真典、原口 雅史、佐々木 龍、宮明 寿光、  
市川 辰樹、高槻 光寿、江口 晋、吉浦 孝一郎、中尾 一彦

Hepatology International, in press.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻  
(主任指導教員：中尾 一彦教授)

## 緒 言

近年、細胞から分泌される細胞外小胞(Extracellular vesicles : EVs)は、様々な病態制御に働くことが報告され、新たな診断バイオマーカーとしても期待されている。肝疾患においても、EVs と肝病態との関連はこれまで数多く報告されている。しかしいずれも血清中 EVs を解析した報告である。血清中の EVs は、様々な臓器細胞に由来する EVs で構成されており、正確に肝細胞で起こる変化を反映しないと考えられる。そこで今回我々は、胆汁中の EVs に着目した。胆汁中 EVs は肝細胞と胆管細胞のみから分泌されるため、肝病態をより正確に反映する可能性があると考えられる。

## 対象と方法

2015年7月から2016年12月の期間、生体肝移植術を施行した21例のレシピエント(末期肝不全)と18例のドナー(正常肝)を対象とした。レシピエントとドナーの胆汁は、肝移植術中の摘出胆嚢内から、術後はレシピエントのみ留置胆管チューブから、術後7日、術後14日に採取した。胆汁5mlより超遠心法にてEVsを抽出し、Nano Tracking Analysis(NTA)でEVs粒子数と粒子径を解析した。さらに、EVsよりRNAを抽出後、次世代シーケンサー(NGS)を用いて、EVsに内包されるmicroRNA発現を網羅的に解析し、高発現のmicroRNAについてはqPCRにより定量評価を行い、背景肝疾患との関連について解析を行った。

## 結 果

レシピエントは全例末期肝不全症例であり、背景肝は HCV7 例、アルコール性 5 例、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 3 例、自己免疫性肝炎 2 例、その他 4 例であった。5 例に肝細胞癌の合併を認めた。EVs 濃度、粒子径を NTA にて解析したところ、レシピエントの胆汁中 EVs 濃度は、ドナーと比較し有意に高値であった。さらに移植後は、術後 7 日、14 日と EVs 濃度は低下し、ドナーと同程度となった。また、肝細胞癌合併例では有意に EVs 濃度は高値であった。一方、EVs 粒子径は、肝移植前後、基礎疾患、肝細胞癌の有無でいずれも差が見られなかった。

内包される microRNA を NGS にて解析したところ、ドナー 461 種、レシピエント 465 種の microRNA が同定された。両群間で microRNA の多様性に差は認めなかったが、発現量が多い 43 種類の miRNA のうち、38 種 (88.4%) は、レシピエント胆汁中 EVs において高発現であった。qPCR 解析では、レシピエント胆汁中 EVs において、miR-17、miR-92a、miR-25、miR-423、miR-451a が有意に高値であった。また背景肝による比較では、miR-17 の発現がアルコール性末期肝不全症例で有意に高値であった。

胆汁中 EVs の miRNA 発現量変化が血清中に反映されるかを明らかにするために、各患者の血清中 miRNA 発現量と比較したが、両群間に有意な相関関係は認めなかった。

## 考 察

本研究では肝臓から直接分泌される胆汁 EVs に注目し解析を行った。NTA 解析では、胆汁中の EVs 濃度は末期肝不全状態、特に肝細胞癌合併例で増加し、肝移植後は速やかに減少していた。このことは、末期肝不全状態の肝微小環境に曝露される肝細胞から分泌される EVs 分泌量は通常より増加していることを示唆している。また EVs 分泌量は正常細胞よりも癌細胞で高いことが報告されているが、本研究においても肝癌症例では EVs 濃度が高値となっており、肝細胞癌診断においても、胆汁中 EVs 濃度測定が有用である可能性がある。しかし、細胞極性を失い、EVs 分泌能も変化している肝細胞癌細胞からどのようにして胆管中へ EVs が分泌されているか不明な点も多く、今後より詳細な検討が必要である。

胆汁 EVs に内包される miRNA のうち、末期肝不全状態において、5 種類の microRNA 発現量は有意に高値であった。特に miR-17 はアルコール性の末期肝不全で有意に高値であり、これは既報と同様であった。miR-17、miR-92a、miR-25 などは、oncogenic miRNA として知られており、新たな肝細胞癌の治療標的候補 microRNA となる可能性がある。一方で、胆汁中に分泌された EVs の標的細胞やその役割については本研究では解明できておらず、今後さらに解析を行う必要がある。

結論として、肝臓より胆汁中に分泌される EVs 分泌量、内包 microRNA は、肝病態により変化することが示された。また、胆汁中 EVs に内包される miRNA 発現は、血清中の発現と独立して変化しており、肝疾患において肝微小環境を直接的に把握できる新たなバイオマーカーとなりうる可能性があると考えられた。