

研究課題名	microRNA の網羅的解析を用いた好酸球性消化管疾患のバイオマーカーの探索
フリガナ	オオシマ ナオキ
代表者名	大嶋 直樹
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学医学部 第二内科 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	平成 30 年度 発表予定

研究結果要約

好酸球性消化管疾患（EGID）は遅延型食物アレルギーの一つであり、消化管に多数の好酸球が浸潤し慢性炎症が起こる病態である。近年、患者数は急激に増加傾向であるが、診断方法、治療に関しては未だ確立されていない部分が多い。我々は、消化管粘膜局所における microRNA（miRNA）に着目し、どのように病態形成に関与しているのか、またバイオマーカーになり得るのかを明らかにすることを目的に研究を行った。

本研究では未治療の好酸球性食道炎（EoE）患者を対象に、内視鏡下生検における食道粘膜の miRNA、mRNA 発現を網羅的に解析し、逆流性食道炎（RE）患者との比較を行った。その結果、EoE 患者と RE 患者の間で明確な miRNA、mRNA 発現パターンの相違を認め、mRNA だけではなく miRNA の発現プロファイルも極めて欧米と類似していることが明らかになった。これは EoE の病態は RE とは異なる機序で成り立っており、本邦と欧米で同一であることを示唆するものであった。さらにプロトンポンプ阻害剤による治療の前後において、数種類の miRNA、mRNA 発現の変動を認めた。加えて、特定の miRNA は治療におけるバイオマーカーの候補となり得るものであった。以上の結果から、本研究により EoE 患者における食道粘膜の miRNA 発現の意義と今後の EGID 研究の展望を明確にすることができた。

研究目的

好酸球性消化管疾患（EGID）は遅延型食物アレルギーの一つであり、消化管に多数の好酸球が浸

潤し、慢性炎症が起こる病態である。食道のみに病変が存在するものを好酸球性食道炎（EoE）、胃や腸管に主に病変を認めるものを好酸球性胃腸炎（EGE）と分類し、いずれも病態形成に食物アレルギーが大きく関与している。

EGID、特に EGE は治療によって一時的に緩解状態となっても、その後高頻度に再発を繰り返し、最終的には狭窄や穿孔に至る難治性の疾患であるが、診断方法、治療に関しては未だ確立されていない部分も多い¹⁾。我々は日本で最初の EoE 症例を発見して以来、一貫して成人の EGID の研究を遂行しており、すでに多数のエビデンスを報告している²⁻⁴⁾。その中で、EoE 患者の食道粘膜を材料としてマイクロアレイ解析を行い、mRNA 発現のプロファイルが欧米と極めて類似していることを明らかにした⁵⁾。これらは、日本と欧米の EoE の病態がほぼ同一であることを示唆しているが、疾患活動性や治療効果予測のバイオマーカーにはなり得るものではなく、さらなる探索が必要と考えられる。

MicroRNA (miRNA) は 20 塩基前後の一本鎖 RNA であり、標的とする mRNA に結合して蛋白質の翻訳を抑制し、生体内で重要な役割を果たしている。ヒトでは 1000 種類以上の miRNA の存在が推測されており、種々の疾患に関与することが報告されている。最近、他のアレルギー疾患において血中 miRNA が病態形成のバイオマーカーになる事が示唆されているが、EGID の消化管粘膜における miRNA 発現に着目した研究は欧米においても皆無に等しい。そこで我々は、EGID 患者の miRNA プロファイルを探索し、どのように病態形成に関与しているのか、またバイオマーカーになり得るのかを明らかにすることを目的に本研究を行っていく。

研究計画及び研究手法

1. EoE 症例の食道粘膜局所における miRNA & mRNA 発現の網羅的解析

- ① 活動期の未治療 EoE 患者、コントロールとして未治療の逆流性食道炎（RA）患者を対象とした。尚、EoE は厚生労働省班会議で作成された診断基準に従い、内視鏡検査にて食道内に縦走溝、白斑等を認め、食道粘膜の生検にて上皮内に 20 個/HPF 以上の好酸球の浸潤を認めたものを EoE と診断した。また、RA はロサンゼルス分類に従い内視鏡的観察により食道胃接合部に粘膜障害を認めたものとした。
- ② 上部消化管内視鏡検査時に、病理組織診断のために行う食道粘膜組織の生検に加えて、追加で 2 個採取し、直ちに RNA 抽出用の保存液である RNA later を用いて処理し、その後凍結保存を行った。患者からは患者情報として年齢、性別、発症時期、症状、食物アレルギー情報、血液検査（白血球数、好酸球数、CRP、IgE、アレルギーコンポーネント特異的 IgE）、内視鏡所見、上皮内と粘膜固有層内の好酸球浸潤数、治療反応性に関するデータを集積し

た。コントロールからも同様の患者情報、血液検査のデータ収集を行った。

- ③ RNA later で処理した生検組織は匿名化を行った後に、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて miRNA と total RNA を精製した。その後、委託先であるマクロジェン・ジャパン株式会社において Agilent SurePrint G3 miRNA Human Microarrays, V21 (Agilent®)を用いた網羅的 miRNA 発現解析 (対象ヒト miRNA 2588 種類) を行った。
- ④ 両グループ間で発現の異なる miRNA 群を種々の統計学的手法により選択し、疾患特異的な候補となる数種類の miRNA を絞り込んだ。
- ⑤ また、同じサンプルにおいて Agilent SurePrint G3 Human GE, V3 Microarrays (Agilent®) を用いた mRNA の網羅的発現解析 (対象ヒト mRNA 26083 種類) を同時に行い、EoE と RA において発現の異なる mRNA を同定した。
- ⑥ 続いて、EoE 患者に対して常用量のプロトンポンプ阻害剤 (PPI) による治療を開始し、治療開始 8 週間後に再度上部消化管内視鏡検査を行った。食道内の縦走溝、白斑等の確認を行い、診断時と同様に食道粘膜の生検を行った。さらに症状などの患者情報を再度集積し PPI に対する治療反応性を評価した。
- ⑦ 続いて同様の手法を用いて miRNA、mRNA の網羅的発現解析を行い、治療前後の発現プロフィールを比較した。

●尚、本研究は島根大学医学部付属病院、医の倫理委員会の承認を得て行った。

結果と考察

1. EoE、RE 症例の患者背景

最終的に本研究に同意の得られた EoE 患者 9 名、RE 患者 4 名のエントリーを行った。

EoE 患者は平均 49.9 歳 (37-58)、男女比 8:1 とこれまでの既報の通り中年層の男性が多かった。

また、アレルギー歴は 6 例 (67%) に認め、これも欧米の報告と同様の結果であった。臨床症状は食事のつかえ感、胸やけを約半数に認める一方で、健診や人間ドックで偶発的に指摘された無症候性 EoE も一定の割合で存在する事が明らかになった。内視鏡的所見では EoE に特徴的とされる縦走溝 (食道粘膜に縦走する数条の溝状の陥凹所見) を全例に認め、さらに白斑、浮腫、リングを合併していた。病理組織学的所見では全例に食道粘膜内に 15 個/HPF 以上 (平均 38 個、20-68) の好酸球の浸潤を認め、EoE の診断基準に矛盾しない結果だった。また、一部の症例では食道基底細胞の過形成や上皮内の好酸球微小膿瘍を認めた。血液学的所見では末梢血の好酸球数は平均 230/ul (126-328) であり、IgE 215.65 (52-531) と上昇を認めた。

一方、RE患者は平均39歳(25-45)、男女比4:0と比較的若年層の男性であった。また、全例無症候性であり、これは健診、人間ドックで偶発的に指摘された症例が多かったことが原因と思われた。内視鏡的所見では食道胃接合部に5mm以下の粘膜障害を認め、全ての症例においてロサンゼルス分類のgrade Aであった。病理組織学的所見では食道上皮内に好酸球浸潤は認めずEoEの合併は否定的であった。

以上の結果はこれまでの報告と同じ傾向であり、EoEとREの臨床像や内視鏡的、病理学的背景を明確にすることができた。

2. 食道粘膜における mRNA 発現の網羅的解析

研究手法で述べたように Agilent SurePrint G3 Human GE, V3 Microarrays (Agilent®)を用いて mRNA の網羅的発現解析(対象ヒト mRNA 26083 種類)を行った。図1に示すように階層型クラスター分析において EoE患者と RE患者の間で、明確な mRNA 発現パターンの相違を認めた。また、RE患者と比較して EoE患者において413遺伝子の発現亢進、497遺伝子の低下を認めた。これらの結果は欧米の報告と同様の傾向を認め、EoE患者における食道粘膜の mRNA 発現プロファイルは人種差を認めないことを裏付ける結果であった。

3. 食道粘膜における miRNA 発現の網羅的解析

続いて、同検体を用いて Agilent SurePrint G3 miRNA Human Microarrays, V21 (Agilent®)による網羅的 miRNA 発現解析(対象ヒト miRNA 2588 種類)を行った。図2に示すように階層的クラスター分析において、mRNAと同様に EoE患者と RE患者の間で明確な miRNA 発現パターンの差を認めた。また、EoEとREを比較して13miRNAの発現亢進、10miRNAの発現低下を認めた(図3)。これらの結果をこれまでの欧米の報告で報告された EoE患者の食道粘膜における miRNA 発現と比較すると、発現プロファイルは mRNAと同様に欧米の報告と極めて類似していた。

これらの結果により、EoE患者の食道 miRNA 発現において日本人と欧米人の相違は認めないことが明らかになった。さらに EoEの病態形成において miRNA 発現は重要な役割を担っていることが示唆された。

4. PPI の治療前後における食道粘膜の mRNA、miRNA 発現の変化

EoE 患者 9 名に対して常用量の PPI の内服治療を 8 週間行った。その後、再度上部消化管内視鏡検査を施行し、内視鏡的評価を行うと同時に、生検にて食道上皮内の好酸球数を確認し組織学的な評価を行った。その結果、77.8% (7/9) の EoE 患者において内視鏡的、組織学的な改善を認めた。また、それらの患者では食道つかえ感などの症状も消失していた。以上の結果はこれまでの既報と同様の傾向を認めた。

続いて、PPI の投与により EoE の改善を認めた 3 症例を対象に、治療前後における食道粘膜の mRNA、miRNA 発現を比較した。その結果、図 4、5 に示すように治療の前後で mRNA、miRNA の発現プロファイルの変化を認めた。特に数種類の miRNA に関しては、治療前に RE 患者と比較して発現亢進を認めていたが PPI 治療によって低下しており、EoE の治療におけるバイオマーカーになる可能性が示された。現在、それらの変動 miRNA に関して mRNA との統合解析中であり、miRNA による mRNA の制御、さらには標的関係の絞り込みを行っている。

以上で得られた研究結果を基に、平成 30、31 年度に行われる第 105 回日本消化器病学会総会、Digestive Disease Week (DDW 2019)にて口演発表の予定であり、論文報告のための投稿準備も同時に進めている。

今後の研究活動について

今後は、今回症例数の不足により解析ができなかった好酸球性胃腸炎 (EGE) に関しても同様の研究を進め、EoE と EGE における miRNA、mRNA 発現プロファイルの共通、相違点を明らかにしていく。欧米人と比較して日本人に多く認める EGE の実態を明らかにしていくことは病態解明の観点からも非常に有意義と思われる。

また、今回の研究で疾患バイオマーカーの候補として明らかになった数種類の miRNA に関しては、末梢血サンプルでの分析を進め、治療効果の予測因子になり得るかどうかを明らかにしていく。さらに、我々が樹立している EoE 患者の食道上皮培養細胞を用いて、それらの miRNA の機能解析を進めていく予定である。

今後も日本で最多の成人 EGID 患者の診療実績を生かして、EGID の臨床サンプル、特に内視鏡下で得た消化管の生検材料を用いた臨床研究を推進し、本邦の食物アレルギー研究の一端を担いたいと思っている。

参考文献

- 1) Kinoshita Y, Furuta K, Ishimura N, Ishihara S, Sato S, Maruyama R, Ohara S, Matsumoto T, Sakamoto C, Matsui T, Ishikawa S, Chiba T. Clinical characteristics of Japanese patients with eosinophilic esophagitis and eosinophilic gastroenteritis. *J Gastroenterol.* 2013 Mar;48(3):333-9.
- 2) Okimoto E, Ishimura N, Oshima N, Ishihara S, Kinoshita Y. Locations of linear furrows in patients with esophageal eosinophilia. *Dig Endosc.* 2016 Aug 4.
- 3) Jiao D, Ishimura N, Oshima N, Kinoshita Y. Similarities and differences among eosinophilic esophagitis, proton-pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia, and reflux esophagitis: comparisons of clinical, endoscopic, and histopathological findings in Japanese patients. *J Gastroenterol.* 2016 Apr 23.
- 4) Oshima N, Ishihara S, Ishimura N, Kinoshita Y. Epidermal differentiation complex protein involucrin is down-regulated in eosinophilic esophagitis. *Esophagus.* 2017;14(3):171-177.
- 5) Shoda T, Morita H, Nomura I, Ishimura N, Ishihara S, Matsuda A, Matsumoto K, Kinoshita Y. Comparison of gene expression profiles in eosinophilic esophagitis (EoE) between Japan and Western countries. *Allergol Int.* 2015 Jul;64(3):260-5.

以上