

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-77217

(P2017-77217A)

(43) 公開日 平成29年4月27日(2017.4.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 2 4
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2015-207161 (P2015-207161)  
 (22) 出願日 平成27年10月21日 (2015.10.21)

(71) 出願人 803000056  
 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
 東京都千代田区岩本町二丁目11番1号  
 (74) 代理人 110001427  
 特許業務法人前田特許事務所  
 (72) 発明者 右田 清志  
 長崎県大村市久原2-1001-1 独立行政法人国立病院機構 長崎医療センター内  
 (72) 発明者 八橋 弘  
 長崎県大村市久原2-1001-1 独立行政法人国立病院機構 長崎医療センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカー、自己免疫性肝炎の診断補助方法、及び、キット

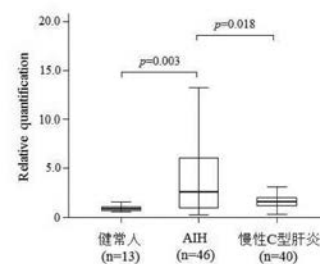
(57) 【要約】

【課題】迅速且つ的確なAIHの診断を可能とするバイオマーカーを提供する。

【解決手段】自己免疫性肝炎を診断するためのバイオマーカーであって、miR-21-5pであることを特徴とする。miR-21-5pの発現量の増加を指標として自己免疫性肝炎の罹患を診断する。自己免疫性肝炎が進行して肝組織の線維化が進行すると、miR-21-5pの発現量は低下する。これにより病気の進行度も把握することが可能である。

【選択図】 図3

各種疾患での血清miR-21-5pの比較



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

自己免疫性肝炎を診断するためのバイオマーカーであって、miR-21-5pであることを特徴とするバイオマーカー。

## 【請求項 2】

前記miR-21-5pの発現量の増加を指標として自己免疫性肝炎の罹患を診断することを特徴とする請求項 1 に記載のバイオマーカー。

## 【請求項 3】

自己免疫性肝炎が進行して肝組織の線維化が進行することにより、前記miR-21-5pの発現量が低下することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のバイオマーカー。

10

## 【請求項 4】

生物学的試料中のmiR-21-5pの発現量を測定する工程を含むことを特徴とする、自己免疫性肝炎の診断補助方法。

## 【請求項 5】

前記生物学的試料は、被験者から採取された血清であることを特徴とする、請求項 4 に記載の自己免疫性肝炎の診断補助方法。

## 【請求項 6】

前記miR-21-5pは、リアルタイムPCR法で検出されることを特徴とする、請求項 4 又は 5 に記載の自己免疫性肝炎の診断補助方法。

## 【請求項 7】

自己免疫性肝炎を診断するためのキットであって、生物学的試料におけるmiR-21-5pの発現量を測定する手段を含むキット。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、自己免疫性肝炎を診断するためのバイオマーカー、自己免疫性肝炎の診断補助方法、及び、自己免疫性肝炎を診断するためのキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

肝炎には、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、自己免疫性肝炎（以下、「AIH: Autoimmune hepatitis」と略することがある。）が知られている。ウイルス性肝炎及びアルコール性肝炎については発症の原因物質が明らかとなっているが、AIHについてはまだ解明されていない。AIHは女性に多い疾患であり関節痛・全身倦怠感、食欲低下、悪心、黄疸、発熱等の症状を呈す。多くの症例では、副腎皮質ステロイド投与が極めて良く奏効し、投与によりAST、ALTは速やかに基準値内へと改善するが、治療開始が遅れた場合、有効性は低下する。

30

## 【0003】

AIHの診断は、特異性の高い診断マーカーが存在しないため、ウイルス性肝炎の有無を確認した後、血清トランスアミナーゼ・血清 グロブリン・自己抗体（抗核抗体、抗平滑筋抗体）の検査結果を総合的に判断してなされるものである。2013年版改訂厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班AIH診断指針でも、(1)他の原因による肝障害が否定される、(2)抗核抗体陽性あるいは抗平滑筋抗体陽性、(3)IgG高値（>基準上限値1.1倍）、(4)組織学的にinterface hepatitisや形質細胞浸潤がみられる、(5)副腎皮質ステロイドが著効する、のうち上記項目で1を満たし、2~5のうち3項目以上を認める場合をAIH典型例に該当するとしている。

40

## 【0004】

特許文献 1 には、血清あるいは血漿中の所定の抗サイトケラチン抗体がAIH患者で有意に高値を示し、更に抗体の量が治療に伴って減少することが記載されている。

## 【0005】

近年、血液試料中の肝特異的なmiRNAは既存の診断マーカーに比べて組織特異性が高い

50

ことから、高感度なマーカーとして注目されている。非特許文献1には、AIH患者では、血清内のmiR-941とmiR-1280の発現量が低下していることが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2001-264335号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】「自己免疫性肝疾患における血清内microRNAの発現を解析することで病因解明できる可能性がある」日本消化器病学会,ポスターセッション(肝臓学会)自己免疫性肝疾患4,二宮匡史,2007年

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、上述の技術によってはAIHの迅速且つ的確な診断は十分であるとはいえない。

【0009】

本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、迅速且つ的確なAIHの診断を可能とするバイオマーカー等を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明にかかるバイオマーカーは、自己免疫性肝炎を診断するためのバイオマーカーであって、miR-21-5pであることを特徴とする。

20

【0011】

本発明にかかる自己免疫性肝炎の診断補助方法は、生物学的試料中のmiR-21-5pの発現量を決定するステップを含むことを特徴とする。

【0012】

本発明にかかるキットは、自己免疫性肝炎を診断するためのキットであって、生物学的試料におけるmiR-21-5pの発現量を検出又は定量する手段を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、AIHの迅速且つ的確な診断が可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】AIHに特異的なmiRNAの発現量を示す図である。

【図2】治療前及び治療後におけるmiRNAの発現量を示す図である。

【図3】健常人及び慢性C型肝炎患者と比較したAIH患者のmiRNA-21-5p発現量を示す図である。

【図4】ステロイド治療におけるmiRNA-21-5p発現量を示す図である。

【図5】(A)はASTとの相関を示す図であり、(B)はASTとの相関を示す図である。

【図6】肝硬変進展例におけるmiRNA-21-5p発現量を示す図である。

40

【図7】肝組織の線維化の進行とmiRNA-21-5p発現量との関係を示す図である。

【図8】肝炎の活動性とmiRNA-21-5p発現量との関係を示す図である。

【図9】PBCとAIHとにおけるmiRNA-21-5p発現量の比較を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

【0016】

50

本実施形態にかかるバイオマーカーは、自己免疫性肝炎を診断するためのバイオマーカーであって、miR-21-5pである。

【0017】

miRNAは、タンパク質をコードしない22塩基程度の一本鎖RNAであり、標的mRNAの主に3'非翻訳領域に部分相補的に結合し、分解又は翻訳を抑制することにより、タンパク質の発現を負に制御することが知られている。miRNAは発生、分化、増殖、免疫、細胞死、恒常性等あらゆる生命現象に関与している。現在までにヒトでは約1500種類のmiRNAが同定されている。多くのmiRNAが様々な組織に広く分布しているが、いくつかのmiRNAは組織特異性の高いものが知られている。

【0018】

肝臓には多種類のmiRNAの発現が認められ、miR-941等のようにAIHのバイオマーカーも散見されるが、高感度なものは未だ見出されていない。本発明者はmiR-21-5pがAIHにおいて選択的に高発現することを見出し、かかる新知見に基づいて本件発明を完成させた。miR-21-5pは下記配列を有している。

【0019】

UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA・・・配列番号1

本明細書において「バイオマーカー」とは、自己免疫性肝炎の罹患の有無又は罹患の程度を診断するために、直接又は間接的に利用されるものである。

【0020】

本実施形態においては、miR-21-5pの発現量の増加を指標として自己免疫性肝炎の診断がなされ、具体的には、(A)生物学的試料中に含まれるmiRNAを抽出する工程と、(B)生物学的試料中の本件miRNAの発現量を測定する工程と、(C)本件miRNAの発現量の増加を指標として自己免疫性肝炎を検出する工程と、を含む。

【0021】

生物学的試料は、特に制限されることなく、被験者の血清、血液、唾液、腹水、尿、糞便、胃洗浄液、生検組織等が含まれ、例えば血清を好適に用いることができる。

【0022】

上記(A)工程におけるmiRNAを抽出する方法としては、被験者から得られる生物学的試料からmiRNAを含むRNAを抽出することのできる方法であれば特に制限されず、例えば、RNAzol RT試薬(Molecular Research Center社)でRNAを抽出後、miRCURY column(EXIQON社)にて精製することによって、miRNAを含むトータルRNAを抽出する方法が挙げられる。

【0023】

上記(B)工程におけるmiRNAの発現量を測定する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば定量PCR法(リアルタイムPCR法を含む)が挙げられる。この定量PCR法は、本件miRNAの配列を増幅し得るプライマーセットを用いる方法であり、本件miRNAの発現量を測定することが可能である限り特に制限されず、蛍光プローブ法(例えば、TaqMan(登録商標)プローブ法)、アガロース電気泳動法、SYBRグリーン法等の通常のPCR法を用いることができる。

【0024】

定量PCR法におけるプライマーセットとは、本件miRNAの配列を増幅し得るプライマー(ポリヌクレオチド)の組合せを意味する。上記プライマーとしては、本件miRNAの配列を増幅し得る限り特に限定されないが、フォワードプライマーとリバースプライマーとからなるプライマーセットを例示することができる。プライマーセットは、その配列情報に基づき当該技術分野において周知の方法を用いて化学合成等することにより得ることができる。

【0025】

上記(C)工程において、上記のように測定された本件miRNAの発現量の増加は、具体的には、被験者の生物学的試料中の本件miRNAの発現量が、コントロールの生物学的試料中の本件miRNAの発現量(例えば、健常者の生物学的試料中の本件miRNAの発現量)に比して高い場合に、被験者がAIHであると診断することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

なお、自己免疫性肝炎が進行して肝組織の線維化が進むと肝硬変となるが、かかる場合にあっては本件miRNAの発現量は逆に低下する。これにより本件miRNAには、病態の経過が把握できるという利点がある。

## 【 0 0 2 7 】

また、本実施形態による自己免疫性肝炎を診断するためのキットは、生物学的試料における本件miRNAの発現量を測定する手段を含むものであり、例えば、本件miRNAの配列を増幅し得る、フォワードプライマーとリバースプライマーとからなるプライマーセットを含む。

## 【 実施例 】

10

## 【 0 0 2 8 】

無治療のAIH患者(n=5)血清と健常人(n=5)をmiRNAアレイでスクリーニングし、AIHで特異的に上昇しているmiRNAを同定した(図1)。

## 【 0 0 2 9 】

さらに、無治療AIH(n=5)、治療後寛解時(n=5)の血清を、同様にmiRNAアレイで解析し、AIHで特異的に上昇し、治療後、寛解時に正常レベルまで低下するmiRNAを絞り込んだ(図2)。これにより、miRNA-21-5pがAIHの急性期に特異的に血清中で増加しているmiRNAであることが判明した。

## 【 0 0 3 0 】

次にAIH患者(n=46)、慢性C型肝炎患者(n=40)、健常人(n=13)の血清を用い、確立したmiRNA-21-5p定量PCRで測定した。血清からのmiRNAはQIAGEN社のmiRNeasySerum/plasmaキットを用いて抽出した。miRNA発現レベルの測定において、miRNA抽出に起因する試料間の格差を補正するために、内部標準でmiRNAの発現レベルを補正した。単離手順の前にあらかじめcel-miR-39を血清に添加し内部標準とした。抽出したmiRNAはマイクロキャピラリー電気泳動により評価した(2100バイオアナライザー・アジレントテクノロジー)。

20

## 【 0 0 3 1 】

hsa-miR-21-5p、cel-miR-39はTaqman MicroRNA Assay (applied biosystems by Life Technologies)を用いて逆転写し、リアルタイムPCR法にて発現量を分析した。発現量解析は、cel-miR-39を内部標準として、hsa-miR-21-5pを補正し比較Ct定量法(Comparative Ct Method, Ct法)を用いて計算し相対定量を行った。

30

## 【 0 0 3 2 】

AIH患者においては、健常人及びCHC患者に比べ有意にmiRNA-21-5p発現量が増加していた(図3)。そしてAIH患者において、ステロイド治療(プレドニゾロン平均投与量 $40.3 \pm 11.6$  mg/day 20-60mg/day)でmiRNA-21-5p発現量は低下することが判明した(図4)。

## 【 0 0 3 3 】

さらに、AIH患者の同一血清を用い肝炎の指標であるALT、ASTと、miRNA-21-5pとの相関を調べた所、強い相関を示すことが判明した(図5)。

## 【 0 0 3 4 】

また、肝硬変進展例では、血清miRNA-21-5pが有意に低下することが判明した(図6)。AIHの肝生検組織像との関連を検討した結果、miR-21-5pはAIH肝組織の線維化(staging)の進行と共に低下していた(図7)。なお、肝組織において門脈域より線維化が進展し小葉が改築され肝硬変へ進展する段階を線維化なし(F0)、門脈域の線維性拡大(F1)、線維性架橋形成(F2)、小葉のひずみを伴う線維性架橋形成(F3)までの4段階に区分され、さらに結節形成傾向が全体に認められる場合は肝硬変(F4)と分類される(Staging分類)。図7においてF4におけるmiRNA-21-5pの発現量は、健常者のmiRNA-21-5pの発現量とほぼ同程度であった。

40

## 【 0 0 3 5 】

また、miR-21-5pはAIH肝組織の肝炎の活動性(grading)の上昇と相関することが判明した(図8)。なお、肝組織において壊死・炎症所見はその程度により活動性なし(A0)、軽度活動性(A1)、中等度活動性(A2)、高度活動性(A3)の4段階に区分され、すなわ

50

ち、活動性の評価はpiecemeal necrosis、小葉内の細胞浸潤と肝細胞の変性ならびに壊死 (spotty necrosis、bridging necrosis等)で行われる(Grading分類)。

【0036】

また、同じ自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変症(PBC)との比較では、AIHのほうが有意に血清miR-21-5pが増加していることが判明した(図9)。なお、PBC患者のmiR-21-5pの発現量は、健常者のmiRNA-21-5pの発現量よりもやや高いものであった。

【産業上の利用可能性】

【0037】

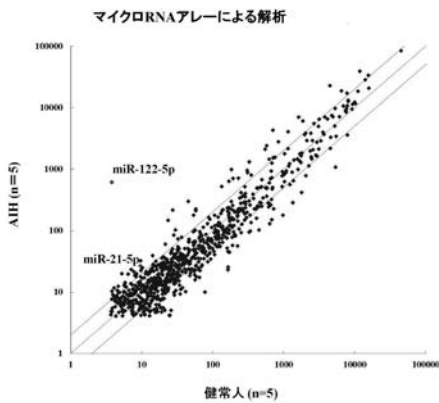
自己免疫性肝炎の診断に利用できる。

【配列表フリーテキスト】

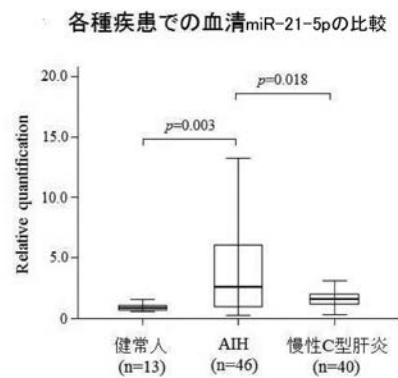
【0038】

配列番号1：マイクロRNA

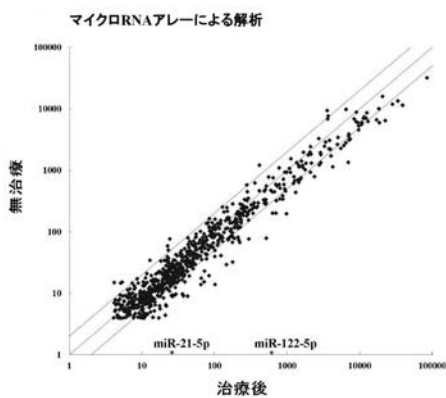
【図1】



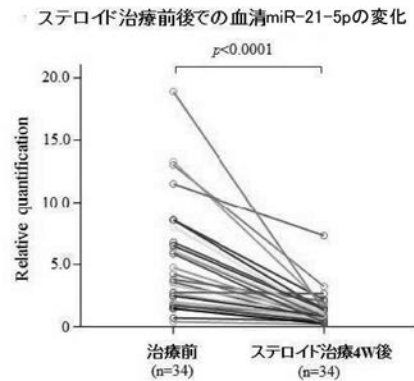
【図3】



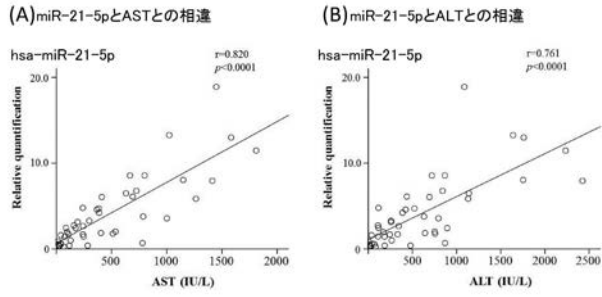
【図2】



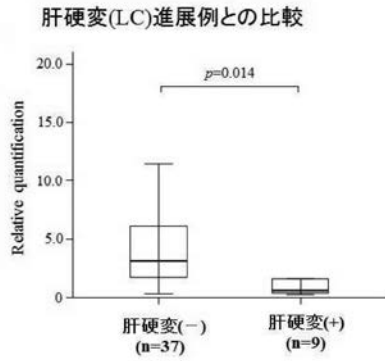
【図4】



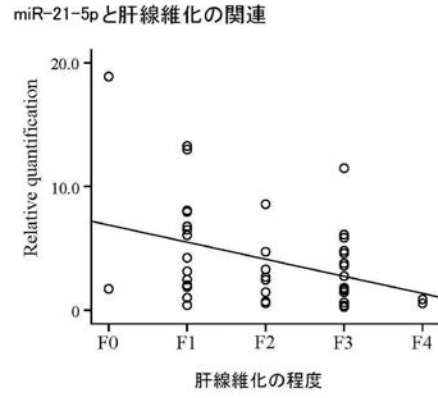
【 図 5 】



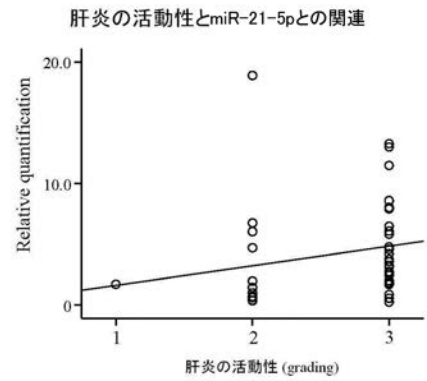
【 図 6 】



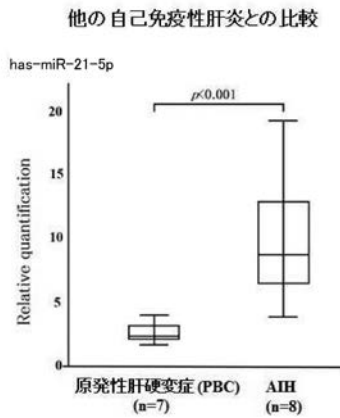
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2017077217000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 小森 敦正

長崎県大村市久原 2 - 1 0 0 1 - 1 独立行政法人国立病院機構 長崎医療センター内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA14 FB01 FB02

4B024 AA11 CA01 CA11 CA12 HA08 HA11

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QR08 QR35 QR42 QR50 QR55 QR62

QR72 QS25 QS28 QS39 QX01

专利名称(译)	生物标志物，自身免疫性肝炎的诊断辅助和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017077217A</a>	公开(公告)日	2017-04-27
申请号	JP2015207161	申请日	2015-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	基金会人文科学基金会		
[标]发明人	右田清志 八橋弘 小森敦正		
发明人	右田 清志 八橋 弘 小森 敦正		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 C12N15/113 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/50.Z C12N15/00.G C12N15/00.A C12N15/11.Z C12N15/113.Z C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6806.ZZN.A C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA14 2G045/FB01 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR08 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS39 4B063/QX01		
其他公开文献	JP6619611B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够及时准确诊断AIH的生物标志物。 解决方案：用于诊断自身免疫性肝炎的生物标志物的特征在于miR-21-5p。使用miR-21-5p的表达水平的增加作为指标来诊断自身免疫性肝炎发病率。随着自身免疫性肝炎进展和肝组织纤维化的进展，miR-21-5p的表达水平降低。可以掌握疾病进展的程度。 点域

各種疾患での血清miR-21-5pの比較

