

- Autoimmune Dis, 2012. 2012: p. 593720.
2. Wu, H. and Y. Zhang, *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation*. *Genes Dev*, 2011. 25(23): p. 2436-52.
  3. Luo, Y., et al., Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *J Autoimmun*, 2013. 41: p. 161-7.
  4. Wang, Y., P.S. Fan, and B. Kahaleh, Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(7): p. 2271-9.
  5. Lei, W., et al., Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol*, 2009. 38(5): p. 369-74.
  6. Lian, X., et al., DNA demethylation of CD401 in CD4+ T cells from women with systemic sclerosis: a possible explanation for female susceptibility. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(7): p. 2338-45.
  7. Jiang, H., et al., Demethylation of TNFSF7 contributes to CD70 overexpression in CD4+ T cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol*, 2012. 143(1): p. 39-44.
  8. Selmi, C., et al., X chromosome gene methylation in peripheral lymphocytes from monozygotic twins discordant for scleroderma. *Clin Exp Immunol*, 2012. 169(3): p. 253-62.
  9. Kubo, M., et al., Persistent down-regulation of Fli1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin. *Am J Pathol*, 2003. 163(2): p. 571-81.
  10. Tahiliani, M., et al., Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009. 324(5929): p. 930-5.
  11. Williams, K., J. Christensen, and K. Helin, DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep*, 2012. 13(1): p. 28-35.
  12. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007. 128(4): p. 683-92.
  13. Beyer, C., et al., Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(2): p. 220.
  14. Jaenisch, R. and A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003. 33 Suppl: p. 245-54.
  15. Mimura, I., et al., Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: epigenetic regulation of the hypoxic response via hypoxia-inducible factor and histone modifying enzymes. *J Pharmacol Sci*, 2011. 115(4): p. 453-8.
  16. Nezam, A., et al. Epigenetics, the holy grail

in the pathogenesis of systemic sclerosis.

Rheumatology, impress.

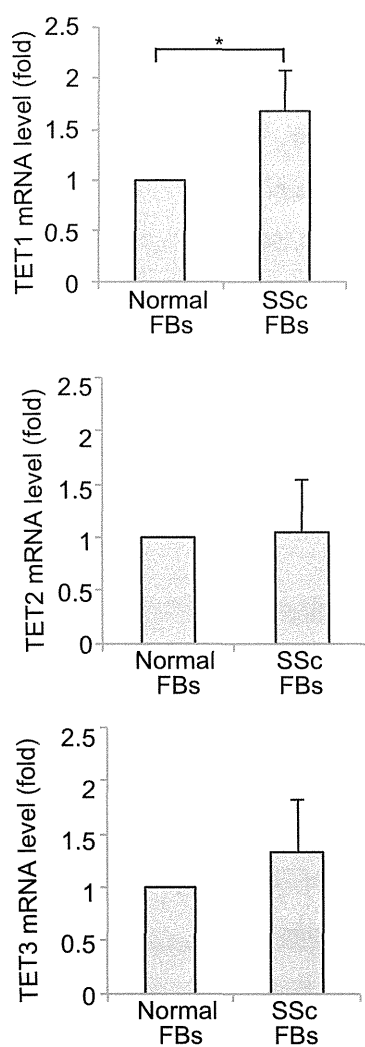


図 1:SSc および正常皮膚線維芽細胞における TETs の発現量の比較

SSc および正常皮膚線維芽細胞における TETs の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって比較した。バーグラフは正常皮膚線維芽細胞のサンプル(1.0)に対しての相対値を示した。(n=5)。

\*P<0.05

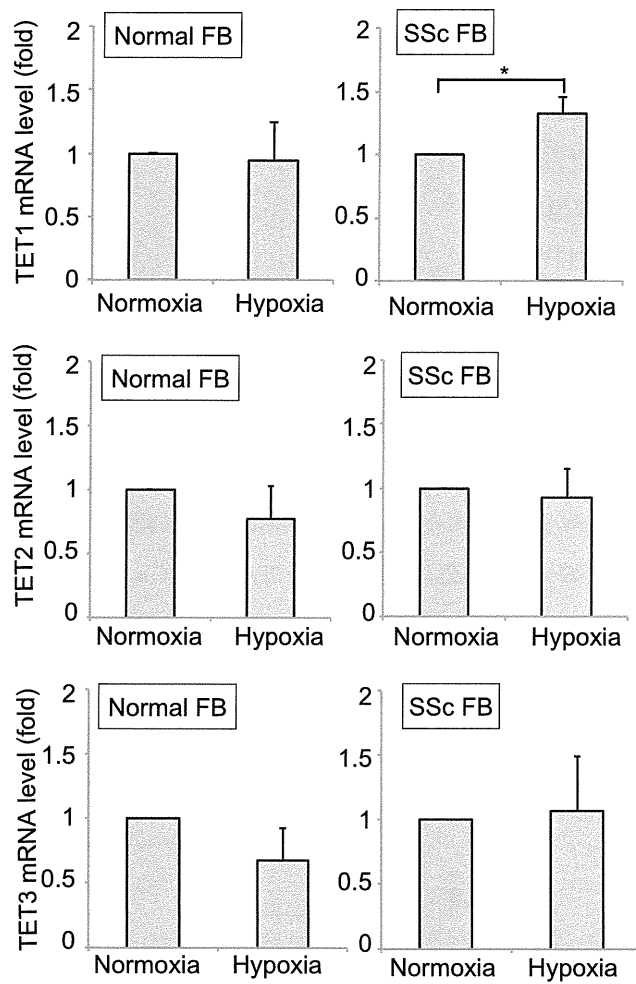


図 2:SSc 皮膚線維芽細胞における低酸素の TET1 発現量への影響

SSc 皮膚線維芽細胞を通常の条件下および低酸素条件下(1%O<sub>2</sub>)で 24 時間培養後、TETs の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって比較した。(n=3) \*P<0.05

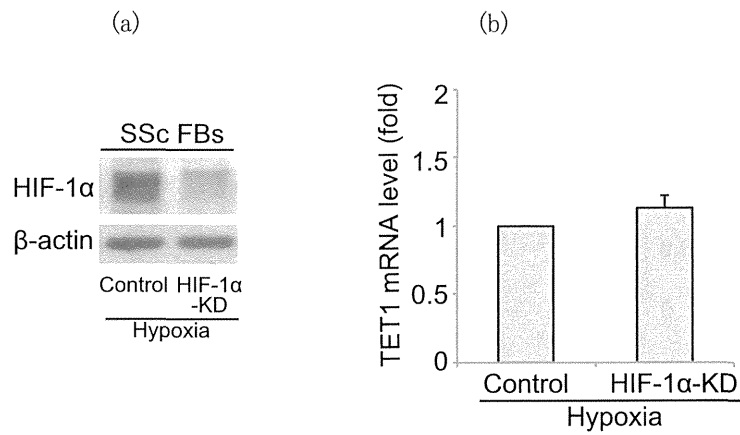


図 3:SSc 皮膚線維芽細胞の低酸素による TET1 誘導における HIF-1 $\alpha$  の関与

(a)siRNA を用いて HIF-1 $\alpha$  をノックダウンした。(b)HIF-1 $\alpha$  KD SSc 皮膚線維芽細胞と通常の SSc 皮膚線維芽細胞とで低酸素条件下の TET1 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法によって比較した。(n=3)

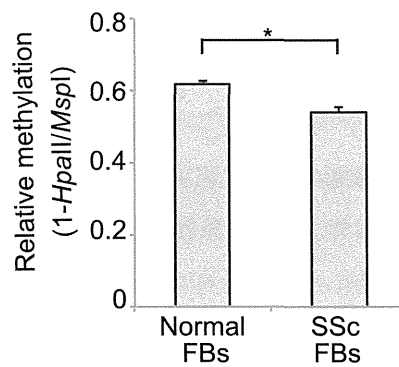


図 4: SSc および正常皮膚線維芽細胞における DNA 全体メチル化量の比較

SSc および正常皮膚線維芽細胞における DNA 全体メチル化量を LUMA 法によって比較した。

(n=1)

## 全身性強皮症、限局性強皮症における miR-196a の発現低下と皮膚線維化の機序への関与について

業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授  
研究協力者 牧野貴充 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 講師  
担当責任者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 准教授  
協力者 本多教稔 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学  
協力者 牧野雄成 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学  
協力者 梶原一亨 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 特任助教

### 研究要旨

全身性強皮症において miR-196a の発現は低下し、その結果 I 型コラーゲンの過剰発現を生じていることを報告した。今回、限局性強皮症患者の病変皮膚組織より micro RNA を抽出し、RT-PCR 法にて健常皮膚およびケロイド皮膚と比較し、miR-196a の発現低下を認めた。また in situ hybridization 法にて、限局性強皮症の皮膚組織での miR-196a の発現低下を認めた。さらに、健常人と比較し、限局性強皮症患者の血清 miR-196a の発現低下を認めた。以上より miR-196a は皮膚線維化に関与していると考えた。

### A. 研究目的

全身性強皮症 (SSc) は、皮膚および肺、心臓、腎臓、消化管など内臓に線維化を生じる疾患であり、膠原病に分類される。限局性強皮症 (LSc) は主に皮膚と皮下組織に生じる線維化異常であり、病変はしばしば、筋組織へ及ぶことがあるが内臓病変を合併することは稀である<sup>(1)</sup>。I 型コラーゲン蛋白は皮膚組織中で最も豊富な細胞外マトリックスであるが、SSc および、LSc の病変皮膚より分離した培養皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン蛋白の合成は亢進していることが知られている<sup>(2)</sup>。SSc と LSc は I 型コラーゲン蛋白の代謝異常や自己免疫異常などの共通点から、両疾患は同様の発症機序を共有している可能性がある

が、相違点としてレイノー現象や内臓病変の有無、自己抗体の種類やサイトカインパターンの違いが挙げられる<sup>(3)</sup>。また、SSc 症は内臓病変を伴う場合は予後不良であり、LSc は通常予後良好であるが、顔面に陥凹性病変や四肢の拘縮を残す場合は著しく QOL を損なう原因となり得る<sup>(4)</sup>。近年、エピジェネティックな遺伝子制御は、細胞の分化や臓器形成、成長、細胞死など様々な細胞機能に関与しており、注目されている。その中で、microRNA (miRNA) は、20-22 塩基から構成され、転写後抑制として機能し、標的 mRNA の非翻訳領域に相補的に結合することにより、蛋白への翻訳を抑制する<sup>(5)</sup>。また miRNA は、免疫異常や癌、代謝異常など様々な疾患の発症機序に関与し

ていると言われている<sup>6)</sup>。前回、我々が報告した、全身性強皮症における miR-196a の発現低下をふまえ、今回、限局性強皮症における miR-196a について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 患者検体

LSc 患者 34 例の血清検体は、初診時に得た。また健常人 22 例より血清をいただき-80℃で保存した。LSc 患者 3 例、ケロイド患者 3 例の皮膚生検組織、また健常人皮膚 3 例は植皮皮膚の不要部より得た。10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。熊本大学医学部付属病院倫理委員会より認められた文書にて十分な説明を行い、署名にて同意を得た。

### 2) 皮膚組織検体からの miRNA 抽出と PCR Array、リアルタイム PCR 実験

miRNeasy FFPE Kit (Qiagen 社) を用いて、miRNA を含んだ RNA を抽出した<sup>7)</sup>。RT<sup>2</sup> miRNA First Strand Kit (Qiagen 社) を用いて、RNA は cDNA に逆転写をした。88 種類のヒト miRNA を検出可能な、96-well RT<sup>2</sup> miRNA PCR Array (Qiagen 社) を用いて、アレイ実験を行った。PCR 増幅は Thermal Cycler Dice (タカラバイオ社) で行った<sup>8)</sup>。リアルタイム PCR の定量化はハウスキーピング遺伝子である U6 を用いた。

### 3) 血清検体からの miRNA 抽出とリアルタイム PCR 実験

miRNeasy RNA isolation Kit (Qiagen 社) を用い、血清検体より miRNA を抽出した<sup>9)</sup>。miRBASE (<http://www.mirbase.org>) を用いて、hsa-miR-196a のプライマーを設計した。

5' -TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG-3'

### 4) in situ hybridization 法

Has-miR-196a に相補的な LNA プローブを用いた。プロテアーゼ K 処理後に、4%パラホルムアルデヒドで固定した。標的遺伝子の結合は 48℃で一晩反応させた。標的遺伝子は免疫学的に検出可能である。

### 5) 統計学的解析

中央値の比較について、マンホイットニー解析を用いた。P<0.05 を有意と判断した。

## C. 研究結果

### 1) 限局性強皮症における miRNA 発現様式

まず初めに、LSc 患者 3 例、ケロイド患者 3 例、健常人 3 名の皮膚組織より miRNA を抽出した。miRNA 量を定量化し、疾患毎に同量の miRNA を混合し、miRNA PCR Array を行った。ヒトの細胞分化や発達に関与する 88 種類の miRNA の発現について解析を行った (表 1)。2 種類の miRNA は LSc において健常人コントロールと比較し、相対的に 10 倍以上高発現していた (橙色)。また多数の miRNA が健常コントロールより発現が低下しており、LSc では 29 種類、ケロイドでは 22 種類であった (黄色)。さらに 10 種類の miRNA は今健常人、ケロイドと比較し、LSc 特異的に発現が低下していた。内訳は miR-9, 10b, 15a, b, 20a, 23b, 99a, 126, 196a であった。その中で、miR-196a は健常人と比較し LSc 皮膚で 4.0 サイクル (0.0063 倍、 $\Delta \Delta Ct$  法) 低下していた。ケロイドと比較し、LSc 皮膚で、3.4 サイクル (0.095 倍、 $\Delta \Delta Ct$  法) 低下していた。今回は miR-196a に注目して検討を進めた。アレイ

解析は1回の実験なので、統計学的検討はできないため、我々はmiR-196a 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 実験を行い、統計学的検討を行った。LSc の皮膚において、健常人とケロイド患者と比較し有意にmiR-196a の発現が低下していることを確認した (p=0.0495、図 1a)。

過去に報告した全身性強皮症の皮膚組織でも同様に健常人と比較し、びまん皮膚硬化型全身性強皮症 (dcSSc) では有意に miR-196a の発現が低下していた (図 1b)。

次に、insitu hybridization 法を用いて、健常人、ケロイド患者の真皮組織内に miR-196a の存在を確認し、LSc 患者では miR-196a の発現は低下していた (図 1c) <sup>(10)</sup>。

## 2) 健常ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン蛋白の制御と miR-196a の機能

まず、miR196a の発現低下によってコラーゲン蛋白の合成が亢進することを確認した。培養健常ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、miR-196a 阻害薬を添加し、miR-196a の発現低下を確認したが (図 2a)、col1A1 mRNA の発現量は変化しなかった (図 2b)。さらに miScript Target Protector を用いて、標的 mRNA に結合し、蛋白への翻訳は阻害しないが、microRNA を阻害すると、I 型コラーゲン蛋白の合成は miR-196a 阻害剤の影響を受けなかった (図 2c)。つまり、miR-196a は  $\alpha 1(I)$  コラーゲン mRNA に直接結合し、制御していると推測された。

## 3) 限局性強皮症患者血清における miR-196a の発現低下

過去に我々は、リアルタイム PCR 検査を用

いて、全身性強皮症の患者血清中の miR-196a を測定可能であること、また cel-miR-39 にて相対的に定量可能であることを報告した <sup>(10)</sup>。

同様に、我々は限局性強皮症患者血清中の miR-196a を測定した。LSc 患者 34 例、健常人 22 例の血清より miRNA を抽出した。皮膚組織での結果と同様に、健常人と比較し、LSc 患者血清中の miR-196a は有意に発現が低下していた (健常人平均値; 0.10, LSc 平均値: 0.014, p=0.033, 図 3)。しかし、血清 miR-196a 値は病型や臨床症状、検査所見との相関はなかった。

## D. 考案

本研究で、我々は皮膚組織を用いて miRNA PCR Array の実験を行い、LSc における miR-196a の発現低下に焦点を合わせた。miR-196a は膠芽腫や食道癌などの様々な悪性腫瘍で検討されてきた。一方で我々は、SSc と LSc で共に miRNA let-7a の発現が低下し <sup>(11)</sup>、LSc とケロイドで miR-7 の発現低下 <sup>(12)</sup>、SSc で miR-196a の発現低下 <sup>(10)</sup> を報告してきた。しかし、miR-196a が LSc の発症機序に関与するかは不明であった。本研究で、SSc と LSc の皮膚線維化の発症機序に、miR-196a が関与していることが明らかとなり、ケロイドにおける線維化とは異なる原因であると推察される。今回の結果は SSc と LSc は同じ領域にある近似した疾患であることを支持する結果となった。

培養細胞に miR-196a の特異的阻害薬を添加することで、I 型コラーゲン蛋白の合成が亢進した。TargetScan

(<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (<http://www.microrna.org/>), DIANAmicroT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>)などのプログラムを用いて、miRNAの標的 mRNAを予測すると、miR-196aはI型コラーゲン蛋白を構成する、col1A1 mRNAとcol2A1 mRNAの両方を制御する主要なmiRNAであった。

また、我々は皮膚組織のみでなく、血清においてもmiR-196aの発現低下を認め、全身性のmiR-196a低下がLScの発症に関与する可能性が示唆された。LScはしばしば診断に苦慮することがあり、Johnson Wらは63%の患者で、LScと診断するまでに、発症から6か月以上の期間を要し、診断の遅れから顔面や四肢の病変部に陥凹を残すことにつながる可能性があるとして述べている<sup>(13)</sup>。血清miR-196aはLScの診断マーカーとなり得る可能性がある。LScの病型や臨床症状、検査所見と、血清miR-196aの相関は認めなかったが、疾患の希少性による症例数の少なさが影響していると考えられ、将来的により大規模な研究が望まれる。過去に我々は、SSc患者血清中のmiR-196aは健常人との差がなかったことを報告している。SScとLScで違いがあることは、LScの病変部における線維化は筋組織や骨など皮下組織まで及ぶ場合があり、局所的な線維化はSScよりも高度であることで説明できる可能性がある。血清miR-196aの低下は、より高度な線維化をあらわしていると推察された。

表1で示すように、健常人、ケロイドと比較しLScで発現が低下しているmiRNAは10種類にのぼり、miR-196a以外にmiR-9, 10b, 15a, b, 20a, 23b, 99a, 126が挙げられる。将来

的に、これらのmiRNAとLScの関連も検討する必要がある。LScは皮膚線維化のモデル疾患となり得る。miRNAによるコラーゲン蛋白の制御機構の解明は、SScおよびLScにおける新しい診断マーカーやmiRNAを用いた皮膚硬化の治療薬の開発に発展する可能性がある。

## E. 結 論

SScと同様、LScの皮膚組織中のmiR-196aの発現は低下していた。さらにLScでは血清中のmiR-196aの発現も低下していた。LScにおいては血清miR-196aは診断マーカーとなる可能性が示唆された。

## F. 文 献

- 1 Rodnan GP. When is scleroderma not scleroderma? The differential diagnosis of progressive systemic sclerosis. *Bull Rheum Dis.* 1981; 31(2): 7-10.
- 2 Asano Y, Ihn H, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Involvement of alphavbeta5 integrin in the establishment of autocrine TGF- $\beta$  signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(8): 1761-9.
- 3 Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford).* 2005; 44(3): 274-9.
- 4 Jinnin M, Ihn H, Asano Y, Yamane K, Yazawa N, Tamaki K. A case of linear scleroderma with muscle calcification. *Br J Dermatol* 2002; 146: 1084-6.



- 5 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- 6 Jinnin M. Various applications of microRNAs in skin diseases. *J Dermatol Sci* 2014; 74: 3-8.
- 7 Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, Fujisawa A, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Maruo K, Ihn H. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 2011; 165: 1003-10.
- 8 Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Honda N, Makino K, Ogata A, Ihn H. Serum levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2010; 162: 751-8.
- 9 Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010; 50: 298-301.
- 10 Honda N, Jinnin M, Kajihara I, Makino T, Makino K, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. TGF- $\beta$ -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. *J Immunol* 2012; 188: 3323-31
- 11 Makino K, Jinnin M, Hirano A, Yamane K, Eto M, Kusano T, Honda N, Kajihara I, Makino T, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type I collagen in systemic and localized scleroderma. *J Immunol* 2013; 190: 3905-15.
- 12 Etoh M, Jinnin M, Makino K, Yamane K, Nakayama W, Aoi J, Honda N, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Ihn H. microRNA-7 down-regulation mediates excessive collagen expression in localized scleroderma. *Arch Dermatol Res* 2013; 305: 9-15.
- 13 Johnson W, Jacobe H. Morphea in adults and children cohort II: Patients with morphea experience delay in diagnosis and large variation in treatment. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 881-9.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Makino T, Jinnin M, Etoh M, Yamane K, Kajihara I, Makino K, Ichihara A, Igata T, Sakai K, Fukushima S, Ihn H. Down-regulation of microRNA-196a in the sera and involved skin of localized scleroderma patients. *Eur J Dermatol*. 2014 ;24(4):470-6.

### 2. 学会発表

第 36 回 日本研究皮膚科学会  
第 42 回 日本臨床免疫学会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表 1. PCR Array 解析による LSc とケロイド、健常人皮膚での miRNA 発現

micro RNA	LSc			Healthy			
	LSc	Keloid	Healthy control	micro RNA (continue)	LSc	Keloid	Healthy control
let-7a	2.97	74.9	-0.12	miR-134	9.67	6.36	6.62
let-7b	2.16	1.06	0.05	miR-137	13.5	68.1	10.4
let-7c	6.42	67.9	3.31	miR-141	8.68	5.53	3.74
let-7d	9.43	7.90	7.18	miR-142-3p	5.41	68.0	5.21
let-7e	6.17	74.9	3.13	miR-142-5p	11.1	12.2	10.1
let-7f	11.37	75.0	9.14	miR-146a	5.83	67.9	2.90
let-7g	4.57	67.9	1.84	miR-146b-5p	6.25	3.47	3.20
let-7i	4.55	2.12	3.16	miR-150	3.37	ND	1.35
miR-1	9.17	8.96	-0.89	miR-155	7.47	6.84	6.99
miR-7	10.6	7.87	7.47	miR-181a	7.33	4.39	5.57
miR-9	12.0	7.65	7.75	miR-182	9.05	67.9	4.90
miR-10a	6.83	74.9	3.45	miR-183	10.6	68.1	7.39
miR-10b	6.47	2.26	1.70	miR-185	8.22	5.98	5.61
miR-15a	7.91	4.40	4.56	miR-18a	9.07	67.9	6.80
miR-15b	6.11	3.12	2.40	miR-18b	8.18	9.42	7.94
miR-16	2.96	-0.12	-1.28	miR-192	8.67	7.26	6.90
miR-17	7.20	4.80	3.80	miR-194	8.78	7.15	6.36
miR-20a	6.69	4.26	3.34	miR-195	2.97	-0.67	-1.43
miR-20b	10.3	8.46	7.44	miR-196a	8.00	4.58	3.96
miR-21	0.68	-4.87	-1.77	miR-205	2.48	0.64	-0.69
miR-22	5.06	1.60	2.59	miR-206	11.9	13.8	3.11
miR-23b	3.57	0.87	-0.84	miR-208	14.2	17.0	10.6
miR-24	2.70	0.25	-0.41	miR-210	8.28	7.03	5.97
miR-26a	1.89	74.9	-1.94	miR-214	6.45	2.62	3.51
miR-33a	11.6	7.83	6.54	miR-215	12.0	74.7	9.72
miR-92a	3.03	1.49	-0.56	miR-218	48.5	74.9	ND
miR-93	7.13	5.24	4.95	miR-219-5p	15.7	11.3	9.56
miR-96	10.7	ND	6.34	miR-222	5.84	68.0	4.42
miR-99a	4.94	1.01	0.55	miR-223	4.66	ND	2.20
miR-100	4.96	1.78	0.83	miR-301a	12.5	10.2	9.51
miR-101	9.03	6.42	4.10	miR-302a	9.47	14.6	12.8
miR-103	5.50	3.07	3.15	miR-302c	12.9	14.2	16.2
miR-106b	7.88	67.8	5.07	miR-345	9.39	8.06	8.31
miR-122	5.87	4.20	10.8	miR-370	8.70	8.84	10.3
miR-124	11.4	12.0	9.30	miR-371-3p	15.1	ND	13.3
miR-125a-5p	4.71	1.91	0.01	miR-375	8.91	8.48	5.10
miR-125b	1.47	-2.36	-3.23	miR-378	7.29	5.78	2.51
miR-126	3.26	0.35	-0.55	miR-424	6.27	0.34	4.99
miR-127-5p	12.5	9.32	11.2	miR-452	11.8	9.70	7.94
miR-128a	8.33	6.15	3.85	miR-488	15.3	14.8	14.2
miR-129-5p	11.1	12.9	9.51	miR-498	18.7	20.8	16.4
miR-130a	9.99	7.69	6.22	miR-503	12.0	8.56	ND
miR-132	9.51	7.07	6.51	miR-518b	14.6	16.4	17.0
miR-133b	12.5	14.8	4.57	miR-520g	13.0	12.0	10.2

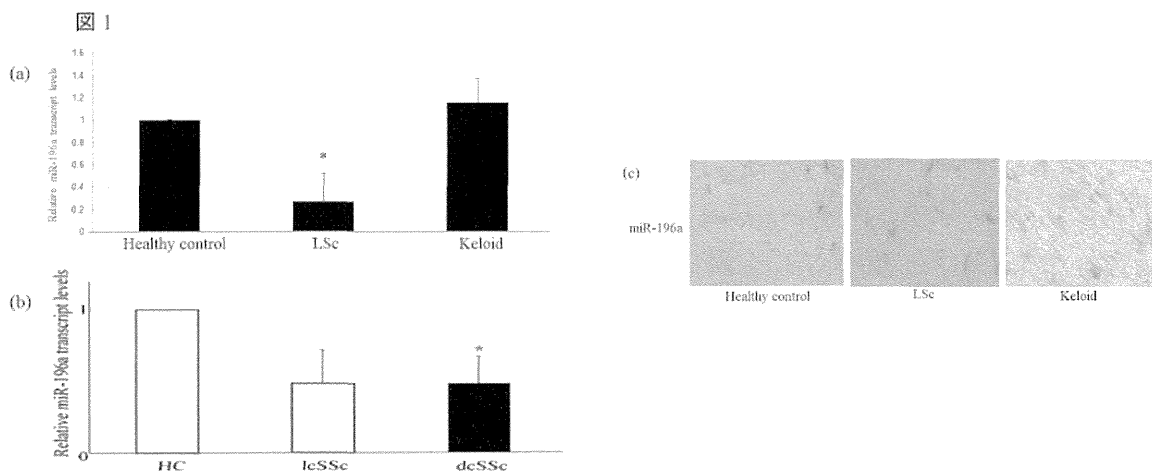


図 1

miR-196a に特異的なプライマーを用いた、リアルタイム PCR を行った。

(a) 健常人、ケロイドと比較し LSc で有意に miR-196a の発現低下を認めた。健常人 3 例、LSc 患者 3 例、ケロイド患者 3 例の皮膚組織中の miR-196a の平均を示す。\*  $p < 0.05$

(b) 健常人と比較し dcSSc で有意に miR-196a の発現低下を認めた。

(c) パラフィン組織中の miR-196a の in situ hybridization 法を行った。LSc 患者の病変部皮膚では miR-196a の発現が低下していた。核は赤染し、miR-196a は茶色に染色される。

図 2

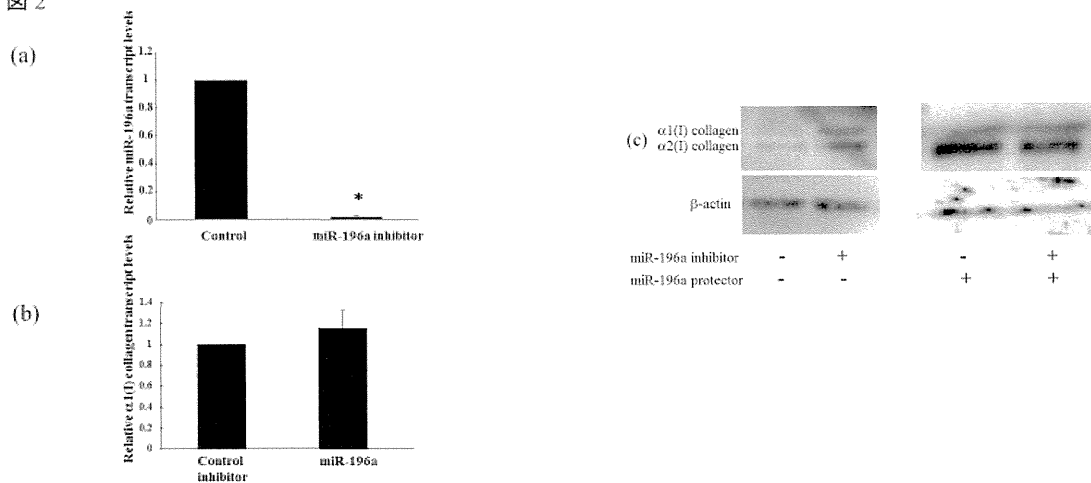


図 2

(ab) 培養 正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、miR-196a 特異的阻害剤を添加した時の (a) miR-196a 、(b)  $\alpha 1(I)$  collagen mRNA の PCR 結果。コントロールを 1 に補正した。

(c) miR-196a protector を添加、無添加の条件で miR-196a 阻害剤添加 72 時間後のコラーゲン蛋白を免疫ブロット法にて検出した。



# 全身性強皮症患者病変部皮膚における long non-coding RNA TSIX の機能の検討

業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

協力者 王 中志 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 研究員

## 研究要旨

蛋白質をコードしない non-coding RNA は、小分子 RNA と比較的長い RNA に分類される。そのうち、200 塩基以上の長さを有する long non-coding RNA (lncRNA) は約 3 万種類以上存在すると考えられているものの、ヒト疾患との関係を示した研究はまだまだ少ない。我々は全身性強皮症患者の病変部皮膚において発現亢進している lncRNA である TSIX を同定し、その機能を解析した。

## A. 研究目的

エキソソーム中の長鎖非コード RNA について発現解析の注目が集まっている。長鎖非コード RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) はタンパク質へ翻訳されていない 200nt 以上の長さの RNAs を言い、ポリ A の有無を問わず、非コード RNAs 内で大きな割合を占め、エピジェネティック制御、転写調節と転写後調節などで遺伝子発現を調節し、生命活動に重要な役割を果たしている、発生変化の促進などにおいて、主たる調節因子として機能している。また、アルツハイマー病、乾癬、癌などの幅広い疾患において、lncRNA の異常発現が観察されている。しかしながら、全身性強皮症における lncRNA 発現に関する報告はない。我々は全身性強皮症患者の病変部皮膚において発現亢進している lncRNA である TSIX を同定し、その機能を解析した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

皮膚組織は熊本大学病院皮膚科を受診したびまん型全身性強皮症患者、限局型全身性強皮症患者、全身性エリテマトーデス患者及び正常人から採取し、直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。患者は全例が American College of Rheumatology の強皮症診断基準を満たしていた。本研究は、Declaration of Helsinki に基づき、倫理委員会の審査を経て、患者および正常人の同意を得て行った。

### 2) 細胞培養

SSc 皮膚線維芽細胞の取得した発症 2 年以内の限局型全身性強皮症患者の前腕から施行した。正常人の皮膚については手術の際に不要となった植皮片を利用した。

### 3) 皮膚組織 lncRNA の抽出

凍結した皮膚組織を水とエタノールで洗浄し、800 $\mu\text{l}$  の Isogen (Nippon Gene) に溶かして、プロトコールに従って皮膚組織 lncRNA の抽出を行った。

### 4) RNA 量とタンパク質量の評価

RNA 量の評価はリアルタイム PCR 法を用いて、

タンパク質量は免疫ブロット法を用いて確認した。

#### 5) In situ hybridization

TSIX 相補的な配列を持つ 5'-locked digoxigenin-labeled nucleic acid probe と scrambled negative control は Exiqon より購入した。正常及び強皮症患者のパラフィン包埋組織を用いて In situ hybridization 方法で施行し、その後標本を光学顕微鏡にて観察した。

#### 6) プレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスを作成

プレオマイシンを PBS に 1mg/ml による希釈し、BALB/c マウスの背部皮内にプレオマイシン 300 $\mu$ g もしくは PBS を 4 週間連日注射した。注射最終日の翌日に背部皮膚を採取後、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

### C. 研究結果

#### 1) 全身性強皮症患者の皮膚組織ならびに培養皮膚線維芽細胞における lncRNA-TSIX の発現

びまん型全身性強皮症患者 10 例、限局型全身性強皮症患者 5 例及び全身性エリテマトーデス患者 3 例および正常人 5 例を対象として、lncRNA-TSIX の量は、皮膚組織と線維芽細胞いずれにおいても正常人より有意に増加していた (図 1-a,c)。in situ hybridization 方法における、TSIX陽性の核の数は強皮症の皮膚で有意に増加した (図 1-b)。

また、TSIX lncRNA の増加が生じる機序として、強皮症の皮膚線維芽細胞で提唱されている自己 TGF- $\beta$ 1 刺激仮説に着目した。予想されたとおり、TSIXは TGF- $\beta$ 1 で刺激を加えた正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞

すべてで発現が増加していた (図 1-c)。興味深いことに、強皮症皮膚由来線維芽細胞で TGF- $\beta$  siRNA を用いて TGF $\beta$  signaling を抑制したところ、TSIX の発現は有意に低下した (図 1-d)。

#### 2) 正常皮膚由来線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞における、TSIX増加の機序

まず、3 例の培養正常皮膚線維芽細胞及び強皮症皮膚由来線維芽細胞にそれぞれ TSIX siRNA を導入し、TSIX のレベル、I type collagen のレベル免疫ブロット法で解析した。I type collagen のタンパク質量は減少した (図 2-a)。次に、TSIX siRNA による I 型コラーゲンの発現低下は、転写レベルまたは翻訳レベルで行われるかどうか判断するために、コラーゲン mRNA およびタンパク質量の安定性を検証した。mRNA の定常状態レベルは遺伝子の転写または mRNA の安定性のレベルによって制御されるため、線維芽細胞に RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を加えることによって、TSIX 存在下でも非存在下でも de novo mRNA の合成はブロックされる。アクチノマイシン D 処置後の I 型コラーゲン mRNA の減少率に 2 群間で有意差は認められた (図 2-b)。同様に de novo タンパク合成及びタンパク分解酵素の発現時シクロヘキシミドでブロックしたところ、TSIX siRNA はコラーゲンタンパクの半減期にほとんど影響を与えなかった (図 2-c)。したがって、TSIX siRNA はコラーゲンの mRNA の安定性には影響と転写レベルに影響を与えていると考えた。

#### 3) プレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスに対する TSIX の効果

コントロールと比較してプレオマイシン誘発性

強皮症モデルマウス群では lncRNA TSIX のレベル著目な増加が認められた (図 3-a)。

## D. 考案

全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞において、TSIX の発現量を増加していた。また全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞において TSIX が増加する機序を検討し、TGF- $\beta$ 1 刺激が関与していることを示した。

TSIX の siRNA により、コラーゲン蛋白が大幅に減少している。その機序として、コラーゲン mRNA の半減期が有意に減少している。蛋白の半減期は減少しないので、mRNA の安定性を変化させると考えられた。強皮症ではコラーゲン mRNA の半減期が伸びていることもコラーゲンが蓄積する一因なので、TSIX が強皮症でのコラーゲン mRNA の安定性の増加に関与しているのではないかと考えた。

そのため、TSIX siRNA でコラーゲンが著明に減少するため、治療のターゲットとして有望と思われる。

## E. 結論

我々の研究により全身性強皮症では lncRNA-TSIX の発現が増加しており、さらに TSIX はコラーゲン mRNA の半減期を制御する事で線維化に関与している可能性がある。

## F. 文献

1. Sarkar SP, Adshead G: Whose DNA is it anyway? European court, junk DNA, and the problem with prediction. J Am Acad

Psychiatry Law 2010,38:247-502.

2. Honda N et al.: miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin  $\alpha$ 3. Am J Pathol 2013,182:206-16.

## G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



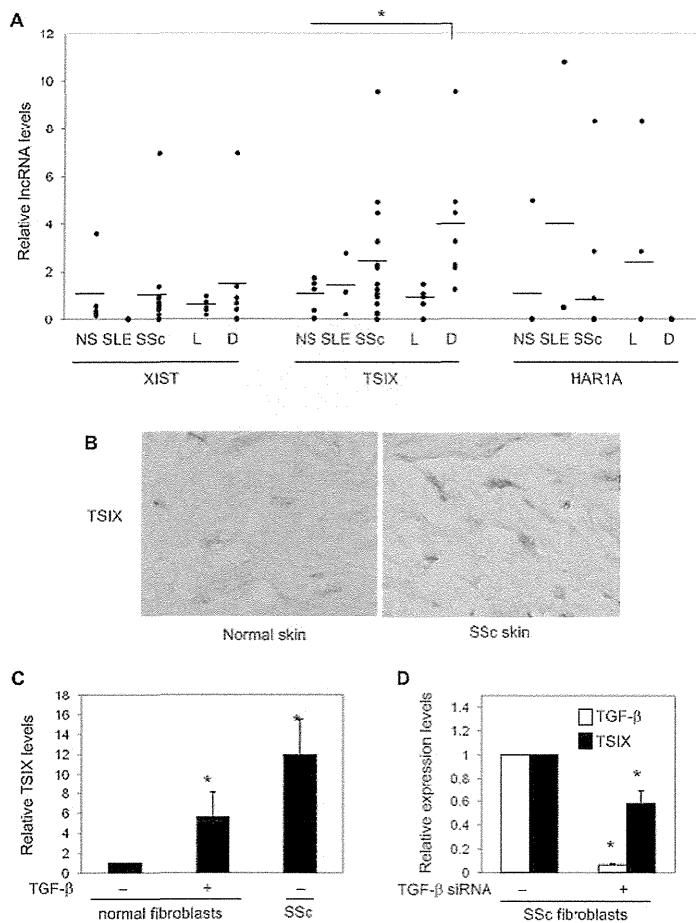


図 1:

- (a) 皮膚組織中 lncRNA 量。びまん型全身性強皮症患者 10 例、限局型全身性強皮症患者 5 例及び全身性エリテマトーデス患者 3 例および正常人 5 例。\* $p=0.012$
- (b) 正常及び強皮症患者のパラフィン包埋組織を用いて In situ hybridization 方法で染色
- (c) 正常皮膚由来繊維芽細胞 (TGF- $\beta$  非投与群、投与群) 及び強皮症皮膚由来繊維芽細胞の相対的 lncRNA TSIX レベルを示す。\* $p<0.05$
- (d) 強皮症皮膚由来繊維芽細胞に TGF- $\beta$  siRNA を導入し、相対的 lncRNA-TSIX レベルを示す。\* $p<0.05$

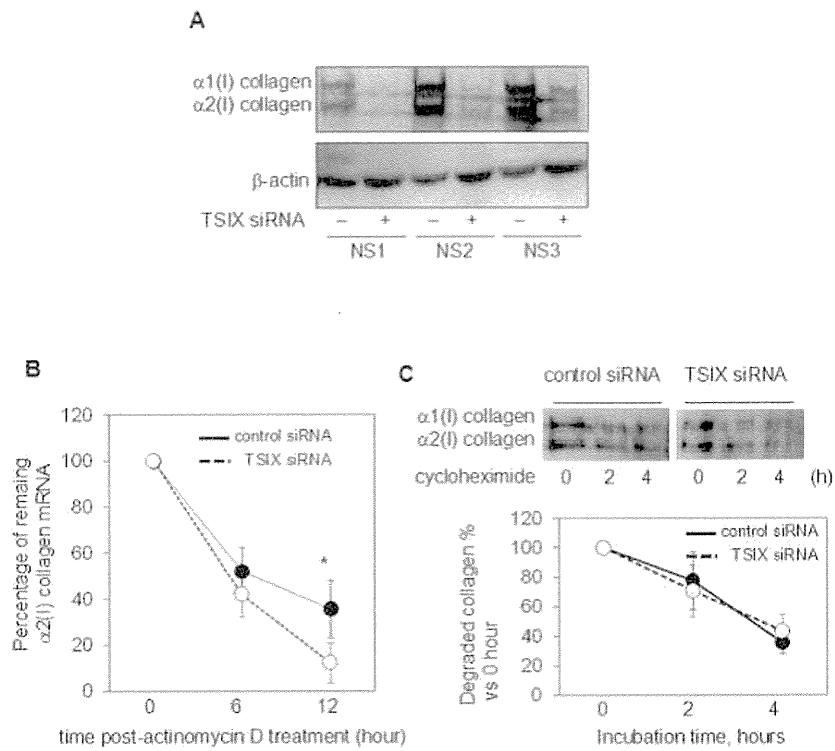


図 2:

- (a) 正常皮膚由来繊維芽細胞に TSIX siRNA を導入し、I 型コラーゲンタンパク質レベルを示す。 $*p < 0.05$
- (b) TSIX siRNA による I 型コラーゲンの mRNA の半減期。
- (c) TSIX siRNA による I 型コラーゲンのタンパク質の半減期。

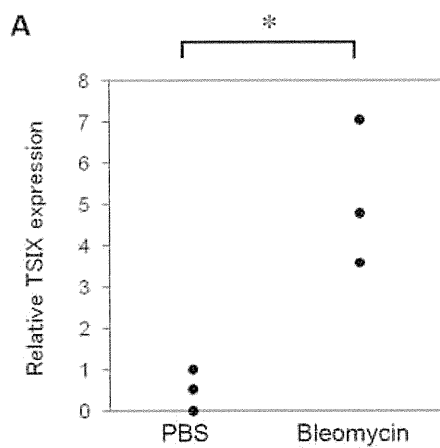


図 3:

ブレオマイシン誘発性強皮症モデルマウスに対する TSIX の効果。

- (a) コントロールとブレオマイシンモデルマウス皮膚から TSIX 比較。 $*p < 0.05$

## 全身性強皮症における progranulin の発現異常とその意義

担当責任者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
担当責任者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
協力者	市村洋平	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	赤股 要	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	野田真史	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	谷口隆志	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	高橋岳浩	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	遠山哲夫	東京大学大学院医学系研究科医学部皮膚科 大学院生
協力者	門野岳史	東京大学医学部附属病院皮膚科 准教授
業務主任者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

### 研究要旨

強皮症皮膚線維芽細胞は様々な形質変化を生じており、TNF- $\alpha$ などの抗線維化作用を持つ細胞成長因子やサイトカインに対する反応性が低下している。今回我々は、TNF 受容体に対するアンタゴニスト作用が報告されている progranulin (PGRN) に注目し、強皮症皮膚線維芽細胞における PGRN の役割について検討を行った。全身性強皮症患者の病変部皮膚では健常人皮膚と比較して、主に皮膚線維芽細胞において PGRN 蛋白の発現が亢進していた。強皮症皮膚線維芽細胞では転写因子 Friend leukemia virus integration 1 (Flil) の恒常的な発現低下がその形質変化に深く関与していることが知られているが、線維芽細胞では PGRN 遺伝子プロモーターに Flil が結合しており、Flil<sup>+/+</sup>マウス皮膚組織では野生型マウスと比較して線維芽細胞において PGRN の発現が亢進していた。また、ブレオマイシン(BLM)誘発強皮症モデルマウスにおいても、皮膚線維芽細胞において PGRN 蛋白の発現亢進がみられた。強皮症皮膚線維芽細胞は TNF- $\alpha$ の抗線維化作用に対して抵抗性であることが知られているが、PGRN 遺伝子に対する siRNA で処理することにより同細胞では TNF- $\alpha$ 刺激により用量依存性に I 型コラーゲン産生が抑制された。さらに、正常皮膚線維芽細胞において、PGRN は TNF- $\alpha$ の抗線維化作用に対して拮抗的に作用した。以上より、強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化した状態を維持する機序に、PGRN の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

全身性強皮症は血管障害と線維化を特徴とする原因不明の自己免疫疾患である。強皮症患者の病変部皮膚では、炎症や血管障害によ

り線維芽細胞が恒常的に活性化され、細胞外マトリックスの産生亢進と分解遅延を引き起こし、結果的に細胞外マトリックスが過剰に沈着する<sup>1</sup>。その分子メカニズムは未だ不明な点が多い

が、我々の検討により、強皮症皮膚線維芽細胞の恒常的な活性化には転写因子 *Fli1* の発現低下が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

PGRN は細胞増殖因子の 1 つであり、分泌型糖タンパクとして広く発現しているが、確立された他のどの細胞増殖因子ファミリーにも属さないという特徴がある<sup>2</sup>。近年 PGRN は細胞増殖、遊走、生存に関与していることが報告されており、創傷治癒、腫瘍発生、神経変性疾患などでの検討が進められている<sup>3-6</sup>。その一方で、PGRN は TNF 受容体に対するアンタゴニストとして機能することも報告されている<sup>7</sup>。

TNF- $\alpha$  は皮膚線維芽細胞において抗線維化作用を発揮することが知られている<sup>8-11</sup>。しかし全身性強皮症では患者血清・皮膚組織での TNF- $\alpha$  の発現亢進が認められるものの、線維化が亢進している。重要なことに、強皮症皮膚線維芽細胞は TNF- $\alpha$  の抗線維化作用に対して抵抗性であることが報告されている。

以上の背景に基づき、今回我々は強皮症皮膚線維芽細胞が恒常的に活性化された状態を維持する機序に PGRN の発現異常が関与している可能性、および PGRN の発現制御に *Fli1* の発現異常が関与している可能性を考え、本研究を立案し、遂行した。

## B. 研究方法

### 1) マウス

BLM 誘発強皮症モデルマウスは、ブレオマイシン (BLM) (Nippon Kayaku Co. Ltd) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、

剃毛したそれぞれのマウス(6 週齢の C57BL/6 マウス)の背部皮膚へ 4 週間にわたり 27 ゲージの注射針で 200 $\mu$ g を連日皮下投与することで作成した。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれマウスに投与した。*Fli1*<sup>+/+</sup> マウスは Arthritis center, division of Rheumatology, Boston University School of Medicine の Maria Trojanowska 氏より供与を受けた。解析にはそれぞれ 5-8 匹のマウスを用いた。いずれの研究も東京大学動物実験規則を遵守して行った。

### 2) 組織病理学的検討

ヒト皮膚検体は発症 2 年以内のびまん皮膚硬化型全身性強皮症患者 5 人の前腕伸側遠位 1/3 から採取した。いずれの患者も臨床所見と病理組織学的所見に基づいて診断され、ほかの膠原病は合併していなかった。コントロール群の検体は年齢、性別、部位がほぼ合致した 5 人の健常人から採取した。研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、また被験者全員から書面上の同意を得た上で行った。4 週間の投与が終了した BLM 誘発強皮症モデルマウス、PBS 投与マウス、*Fli1*<sup>+/+</sup> マウス、および野生型マウスから背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 $\mu$ m 切片を作成した。抗ヒト PGRN 抗体 (R&D Systems)、抗マウス PGRN 抗体 (R&D Systems) による染色を行い、皮膚組織における染色を評価した。以上の検討は皮膚病理に精通した 2 人の検者が盲検し、評価を行った。

### 3) 細胞培養

正常皮膚線維芽細胞は強皮症患者と年齢、性別がほぼ一致した健常人の前腕皮膚から単