

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09738

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAによる角化調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Non-coding RNAs in keratinization

研究代表者

乃村 俊史 (Nomura, Toshifumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50399911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ノンコーディングRNAは生体の恒常性を保つために多様な機能を果たしているが、角化における役割は解明されていない。本研究では、角化をコントロールするノンコーディングRNAの同定を目指した。まず、手掌と前腕から採取した皮膚から抽出したRNAを用いてトランスクリプトーム解析を行い、角化の強い手掌と角化の弱い前腕でRNA発現量を比較した。種々のバリデーションを行い、13種類の候補RNAを同定した。次に、それらのRNAをsiRNAにてケラチノサイトでノックダウンし、3次元表皮を構築し組織学的に解析したところいくつかの候補で角化異常を認めた。これらのRNAは角化を制御する機能を保つことが予想される。

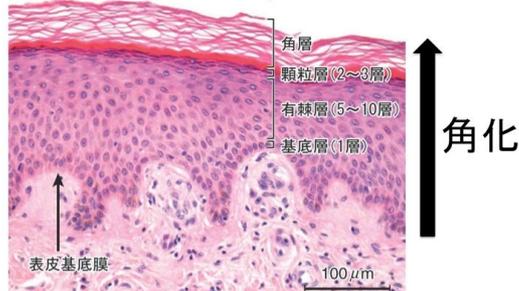
研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs (lncRNAs) play key roles in a variety of processes necessary for homeostasis. However, their effects on keratinization have not been fully elucidated. In this study, we aimed to identify specific lncRNAs that regulate keratinization. First, we performed transcriptome sequencing of keratinocytes sampled from palmar and forearm skin and compared transcriptome profiles between them, since palmar skin is much more keratinized compared to forearm skin. These analyses finally led us to identify 13 candidate lncRNAs that may be involved in keratinization. Next, we knocked down the candidate lncRNAs in keratinocytes. Histological and transcriptional analysis using reconstructed 3D skin culture demonstrated that knockdown of several lncRNAs leads to disruption of keratinization. These data suggest that these lncRNAs could be required for keratinization.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ノンコーディングRNA 角化

1. 研究開始当初の背景

表皮角化細胞は、正常では約 28 日間の規則正しいサイクルで、基底層、有棘層、顆粒層、角層の順に分化するが、この過程のことを角化と呼ぶ。



ノンコーディングRNAが制御？

角化には少なくとも数十種類のタンパク質が関係しており、それらの角化関連タンパク質が厳密にコントロールされた遺伝子発現システムにより、時間的・空間的に秩序立って発現することで、正常な角層が形成される。皮膚の最外層に位置する角層は皮膚バリア機能の要であり、申請者はこれまで角層の形成異常がアトピー性皮膚炎や遺伝性魚鱗癬などの角化異常症を引き起こすことを明らかにしてきた。これらの先行研究により角化の過程に異常をきたす種々の遺伝性角化症の病因解析が進み、現在では角化に重要な遺伝子群の全容がほぼ明らかになってきている。

従来の角化研究

遺伝性角化症の病因遺伝子の同定



その遺伝子/タンパク質が角化に重要
(角化の全体像はわからない)

本研究

ノンコーディングRNAの網羅的解析



角化全体の制御メカニズムの解明
(角化の全体像がわかる)

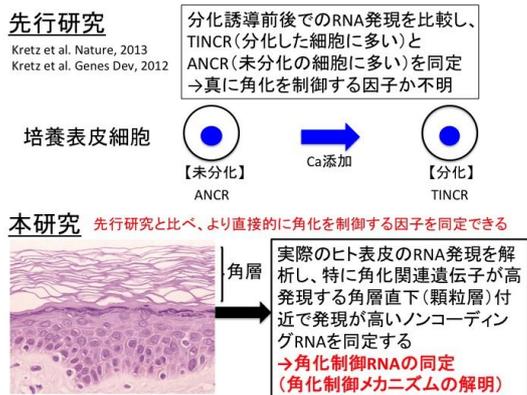
しかしながら、表皮角化細胞が基底層→有棘層→顆粒層→角層の順に分化する際に、こ

れらの遺伝子が必要なタイミングで必要な場所でのみ発現する、角化の精緻な調節機構自体を解明する研究はほとんど行われておらず、現在もその詳細は明らかになっていない。このように、角化メカニズムの全容は未だに不明であり、角化を制御する因子の同定が待たれている。

そのような中、高濃度のカルシウム添加により培養表皮細胞を分化誘導し、その前後での RNA をトランスクリプトーム解析で比較することで、TINCR と呼ばれるノンコーディング RNA が表皮角化細胞の分化を促進し、ANCR と呼ばれるノンコーディング RNA が表皮角化細胞の分化を抑制することを明らかになった。これらの研究成果は、ノンコーディング RNA が表皮の分化におけるマスターレギュレーターである可能性を示唆している。しかしながら、カルシウム添加による培養表皮細胞の分化誘導は通常、表皮における基底細胞から有棘細胞への分化を模したものであり、より角層形成に重要な遺伝子発現の変化が認められる有棘層上層から顆粒層をどの程度反映しているのかは不明である。従って、これらの *in vitro* のデータが生体表皮にもそのまま適用できるかは不明であり、ヒト表皮での角層形成におけるノンコーディング RNA の役割は詳細には解明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ノンコーディング RNA が角化関連遺伝子発現を制御しているという新しい仮説のもとに、次世代シーケンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を行い、角化を制御するノンコーディング RNA の同定を目指した。本研究では、角層が厚い部位と薄い部位の皮膚を同一のヒトから 3 か所ずつ採取し、トランスクリプトーム解析でノンコーディング RNA の発現を比較することで、角化に真に関わるノンコーディング RNA を同定する。さらに、本研究では、同定した角化関連ノンコーディング RNA の表皮内での局在を明らかにし、角化関連遺伝子が顆粒層から角層のレベルで高発現する制御機構を解明する予定である。これらの研究により、ノンコーディング RNA による角化の精緻な調節機構が解明されることが期待される。

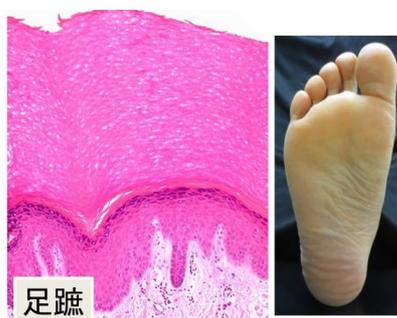


3. 研究の方法

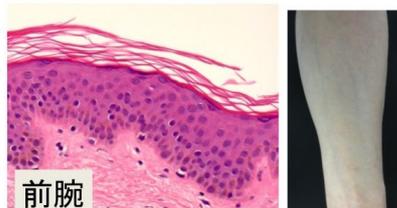
(1) 次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析

まず、同一健康人の足蹠 (高度の角化部位、図 3) および前腕 (通常の角化部位、図 3) のそれぞれ 3 か所ずつから採取した表皮から全 RNA を抽出し、polyA 選択を行った後に cDNA を作成した。得られた cDNA を用いて次世代シーケンサーにて RNA-seq を行い

高度の角化



通常の角化

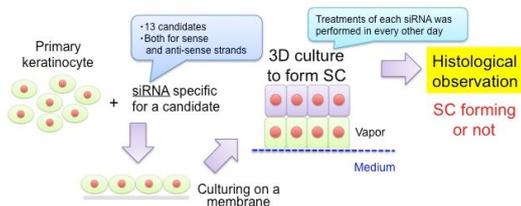


仮説 発現しているノンコーディング RNA の差が角化の程度の差を規定?

トランスクリプトーム解析を行った。バイオインフォマティクス解析にて、足蹠と前腕で発現しているノンコーディング RNA の種類と量を比較し、角化の強い足蹠で有意に増減しているノンコーディング RNA の候補 (角化に関連するノンコーディング RNA の有力候補) をリストアップした。

(2) 三次元培養表皮を用いた機能解析

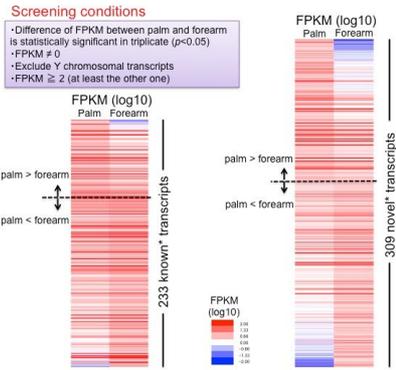
(1) で同定した角化関連ノンコーディング RNA の有力候補を RNAi にてノックダウンし、角化に及ぼす影響を検討した。具体的には、実際の表皮を模した三次元培養表皮を製作し、それぞれの候補ノンコーディング RNA を RNAi にてノックダウンし、光学顕微鏡下で角化異常の有無を詳細に検討した。



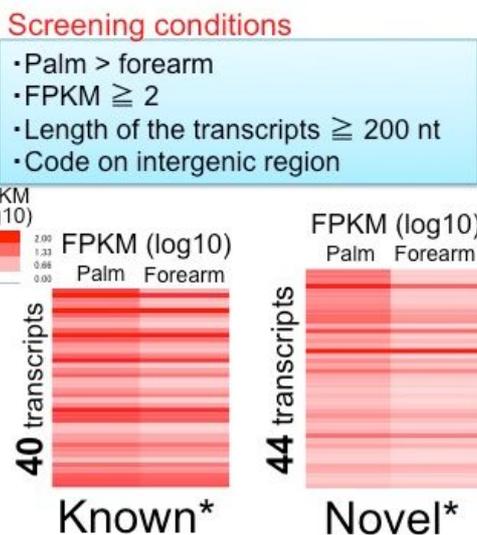
4. 研究成果

(1) 角化関連候補ノンコーディング RNA の同定

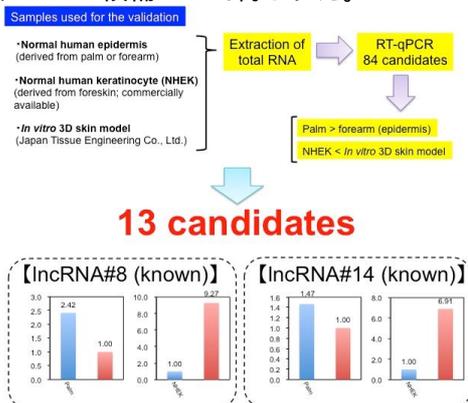
まず、542 種類の RNA が手掌と前腕の間で発現量が有意に異なっていた。



これらの RNA のうち、200 塩基以上で、発現量が手掌 > 前腕かつ FPKM が 2 以上で、遺伝子間に存在するものは 84 種類存在した。

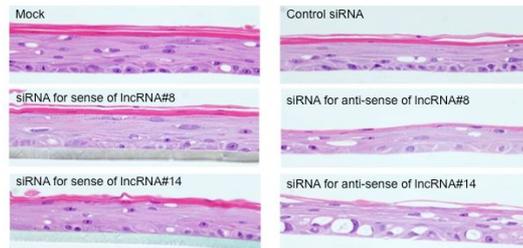


手掌と前腕の表皮由来の RNA を用いて RT-qPCR にて、これら 84 種類の RNA を定量し手掌 > 前腕であったもの、かつ、正常ヒト表皮角化細胞の分化前と分化後で分化後 > 分化前であったものを抽出したところ、最終的に 13 種類の RNA が角化関連ノンコーディング RNA の候補として得られた。



(2) **三次元培養表皮を用いた角化関連ノンコーディング RNA の同定**
上記 13 種類のノンコーディング RNA をノッ

クダウンした表皮角化細胞から三次元培養表皮を作成したところ、2 つの候補 RNA (図の #8 と #14) において、角質の形成異常が認められた。



以上の結果は、角質形成に重要なノンコーディング RNA の存在を強く示唆しており、今後の研究でこれらの RNA の局在や作用機序を解明することで、角化メカニズムの理解がさらに進むことが期待される。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Ohguchi Y, Nomura T (equally contributed), Suzuki S, Takeda M, Miyauchi T, Mizuno O, Shinkuma S, Fujita Y, Nemoto O, Ono K, McLean WH, Shimizu H:
Gentamicin-induced readthrough and nonsense-mediated mRNA decay of *SERPINB7* nonsense transcripts.
J Invest Dermatol 138: 836-843, 2018. 査読有

Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Shinkuma S, Fujita T, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H:

Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes.

JCI Insight 3: e97595, 2018. 査読有

Katayama S, Nomura T (equally contributed), Muramatsu K, Takeda M, Miyauchi T, Suzuki S, Shinkuma S, Fujita Y, Iwata H, Shimizu H:

A severe case of X-linked ichthyosis showing palmar hyperlinearity without *FLG* mutations.

J Eur Acad Dermatol Venereol 31: e119-e120, 2017. 査読有

Suzuki S, Nomura T, Miyauchi T, Takeda M, Nakamura H, Shinkuma S, Fujita Y, Akiyama M, Shimizu H:

Revertant mosaicism in ichthyosis with confetti caused by a frameshift mutation in *KRT1*.

J Invest Dermatol 136: 2093-2095, 2016. 査読有

Miyauchi T, Nomura T, Suzuki S, Takeda M, Shinkuma S, Arita K, Fujita Y, Shimizu H:

Genetic analysis of a novel splice-site mutation in *TMC8* reveals the in-vivo importance of the TMC domain of TMC8.

Br J Dermatol 175: 803-806, 2016. 査読有

Miyauchi T, Nomura T, Suzuki S, Ohguchi Y, Yamaguchi Y, Shinkuma S, Natsuga K, Fujita Y, Shimizu H:

Extensive erythema and hyperkeratosis on the extremities and lumbar area as an unusual manifestation of Nagashima-type palmoplantar keratosis.

Acta Derm Venereol 96: 856-858, 2016. 査読有

Nomura T, Mizuno O, Miyauchi T, Suzuki S, Shinkuma S, Hata H, Fujita Y, Akiyama M, Shimizu H:

Striate palmoplantar keratoderma: Report of a novel *DSG1* mutation and atypical clinical manifestations.

J Dermatol Sci 80: 223-225, 2015. 査読有

Suzuki S, Nomura T, Mizuno O, Fujita Y, Shimizu H: Identification of previously unknown *SERPINB7* splice variants in patients with Nagashima-type palmoplantar keratosis reveals the importance of the CD-loop of SERPINB7.

Br J Dermatol 173: 1288-1290, 2015. 査読有

[学会発表](計8件)

乃村俊史, 清水 宏.

Ichthyosis with confetti の一例 .

第 466 回日本皮膚科学会大阪地方会 , 2018.03.10., 大阪国際会議場 (大阪市、大阪府)

乃村俊史 .

魚鱗癬と掌蹠角化症 : 症例から見えてきたこと .

群馬皮膚科セミナー , 2017.12.14, 前橋商工会議所 (前橋市, 群馬県)

Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H.

Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor.

The 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 2017.09.28., Salzburg Congress Centre (Salzburg, Austria)

乃村俊史, 鈴木翔多朗, 宮内俊成, 竹田真依, 藤田靖幸, 西江 渉, 秋山真志, 清水 宏 . 診断に難渋した先天性魚鱗癬の 1 例 .

第 32 回角化症研究会 , 2017.08.05., 海運クラブ (千代田区, 東京都)

乃村俊史 .

皮膚のバリアとアレルギー .

釧路医師会講演会 , 2017.06.30., 釧路プリンスホテル (釧路市, 北海道)

Ohguchi Y, Nomura T, Suzuki S, Takeda M, Miyauchi T, Mizuno O, Shinkuma S, Fujita Y, Ono K, McLean WH, Shimizu H.

Gentamicin-induced restoration of SERPINB7 by readthrough of a prevalent nonsense mutation c.796C>T in Nagashima-type palmoplantar keratosis.

The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016.12.10, Sendai International Center (Sendai City, Miyagi)

乃村俊史, 清水 宏:

自然治癒する魚鱗癬の 1 例 .

第 373 回日本皮膚科学会岩手地方会,
2016.02.07., 盛岡市民文化ホール (盛岡市,
岩手県)

Nomura T.

Comprehensive analysis of long non-coding
RNAs in keratinization.

The 40th Annual Meeting of the Japanese
Society for Investigative Dermatology,
2015.12.12., Okayama Convention Center
(Okayama City, Okayama)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乃村 俊史 (TOSHIFUMI NOMURA)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 50399911

(2) 研究分担者

清水 宏 (HIROSHI SHIMIZU)
北海道大学・医学研究院・教授
研究者番号: 00146672