

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19729

研究課題名(和文)皮膚筋炎における lncRNA の役割解明

研究課題名(英文)The role of lncRNA in pathogenesis of dermatomyositis

研究代表者

緒方 亜紀(AKI, Ogata)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80433035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：多発筋炎・皮膚筋炎は原因不明の炎症性筋疾患であり、筋肉・肺・皮膚が病変の首座となり急速進行性の間質性肺炎は生命予後を左右する。皮膚筋炎で見られる皮膚症状は多彩で診断が難しく時に難治であり従来の治療に反応しない事も多い。皮疹発症の詳細なメカニズムは不明であり、その解明は早期診断や新たな治療につながる可能性がある。DM患者の血清および組織で lncRNA (dio3os, NTT) が上昇していることを確認し、皮膚筋炎における lncRNA の役割解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Polymyositis and dermatomyositis are inflammatory muscular diseases of unknown origin, muscle, lung, and skin become the mainstay of lesions and rapid progressive interstitial pneumonia affects the prognosis of life. The skin symptoms seen in dermatomyositis are diverse, difficult to diagnose, occasionally refractory, and often do not respond to conventional treatment. The detailed mechanism of eruption is unknown and its elucidation may lead to early diagnosis and new treatment. We confirmed that lncRNA (dio3os, NTT) is elevated in the sera and tissues of DM patients and tried to elucidate the role of lncRNA in dermatomyositis.

研究分野：膠原病

キーワード：皮膚筋炎 long non coding RNA

1. 研究開始当初の背景

多発筋炎 (polymyositis: PM) / 皮膚筋炎 (Dermatomyositis: DM) は原因不明の全身性炎症性自己免疫疾患である。多彩な皮膚病変を伴う場合はDM、皮膚病変を伴わない場合PMと言う。筋肉・肺および皮膚が病変の首座となる。筋病変は主に体幹四肢近位筋に出現し筋力低下を来す。DMで見られる皮膚症状は、ゴットロン徴候・丘疹やヘリオトロープ疹が有名であるが、その他爪上皮出血点や血管炎、mechanic's handなどケプネル現象 (物理刺激や外傷で皮疹が誘発される事) による症状、さらにVサインやショールサインのような光線過敏による症状など多彩である (表1)。皮膚筋炎の中で筋症状を伴わない症例は無筋症性皮膚筋炎 (Amyopathic dermatomyositis: ADM) と称され、急速進行性の間質性肺炎を合併し予後不良例の頻度が高いことが知られている。

表1

	部位	原因	経過
ヘリオトロープ疹	顔	ケプネル現象	急性
顔面紅斑	顔	日光過敏	
ゴットロン徴候・ゴットロン丘疹	手	ケプネル現象	亜急性
Mechanic's hand	手	ケプネル現象	
爪上皮出血点	手	血管障害	
潰瘍	手	血管障害	急性・慢性
血管炎	手	血管障害	急性
レイノー現象	手	血管障害	
Scratch dermatitis (癢打ち様紅斑)	体	ケプネル現象	
Vサイン	体	日光過敏	
ショールサイン	体	日光過敏	
石灰化		血管障害	慢性
筋紡錘炎		血管障害	慢性

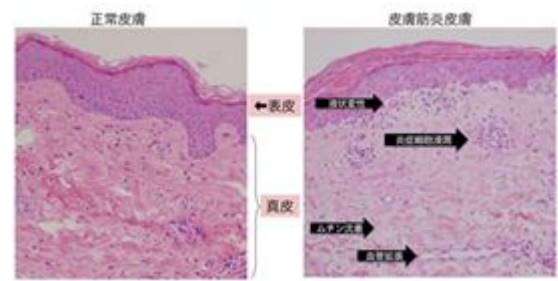
皮膚症状についての臨床面の課題として、1つ目は診断に苦慮すること、2つ目は治療に抵抗性であることが少なくないことが挙げられる。皮膚症状に関して、皮疹が多彩な分、脂漏性皮膚炎や手湿疹をはじめエリテマトーデスや悪性リンパ腫や中毒疹、成人スティル病など、類似した皮膚病変を呈する疾患がいくつも存在するため診断が困難である。また、同じ顔面の紅斑をとってみても個疹一つ一つが非常にバラエティに富み共通点に乏しく特異的な所見がないため見逃されやすい (図1)。さらに本症の皮膚病理所見は液状変性・炎症細胞浸潤・ムチン沈着や血管拡張などが知られているが (図2)、皮膚筋炎に特異的な変化ではないため皮膚生検のみで確定診断に至らないことが診断をさらに困難にしている。特にADMでは筋症状を欠くため、現在広く使用されているBohan & Peterの診断基準を満たさず皮疹のみから診断する必要があるため、重症の間質性肺炎を合併して初めて無筋症性皮膚筋炎が疑われることもある。また成人DM患者の約30%に内臓悪性腫瘍が合併し、PMに比しDMでの合併率が高いといわれている。DMの診断とともに進行した悪性腫瘍が見つかり、筋炎の治療と悪性腫瘍の治療の優先度を決める際に頭を悩ます症例に遭遇することもあり、早期に皮膚筋炎と診断し、悪性腫瘍の合併の有無を検索することは非常に重要である。また皮膚筋炎の治療に関して、顔面・頸部など

の露光部に皮疹が出現しやすい事から患者のQOLはひどく損なわれている事が多いが、ステロイドや免疫抑制剤の内服にて筋炎症状や肺炎のコントロールは出来ても、皮疹のみが残存し、副作用の観点からある程度の皮疹の残存は許容しつつも、それ以上の皮疹の増悪を避けるためにステロイドや免疫抑制剤を低用量で継続せざるを得ない症例など、難治な事も多い。

図1



図2



一方、研究面においては、皮疹の原因としてケプネル現象や血管障害さらには光線過敏など複数の異なる機序が考えられているが、詳細なメカニズムは不明である。さらにムチン沈着など各病理組織所見の意義や原因もまだ判明していない。

以上よりDM皮膚の表皮や血管などに特異的に発現する遺伝子や蛋白を同定できれば類似疾患との鑑別やADM早期発見の際に非常に有用であると考えられ、さらにそれらの分子の働きを明らかにすることで病態が解明され新規治療につながる可能性がある。

病態として、細胞レベルでは、CD4+T細胞、B細胞、樹状細胞が、DM筋膜周囲間質、血管周囲に浸潤しているのが認められることが以前から分かっている。また近年、サイトカインの関与が明らかになり、TNF- $\alpha$  は、MHCクラス分子、ICAM-1等の接着分子の発現を誘導し、T細胞を始めとした炎症細胞を筋線維に集積させること、また正常の筋芽細胞に炎症刺激が加わるとIL-6や単核球の接着分子 (MCP-1) が局所で増加し単核球の遊走や慢性炎症を引き起こすことなどが報告されている。その他、IL-15、IL-17、IL-18等サイトカインとの関連が明らかになってきた。一方これまでDMの皮

疹の解析対象としては主にμチンやmRNAが注目されているが、皮膚筋炎皮膚特異的分子の同定には至っていない(Wong D et al. PloS One 2012, Kim JS et al. J Invest Dermatol 2012など)。我々の教室でもこれまで皮膚筋炎特異的microRNAの検索などを行っていたが(Okada Y et al. Int J Dermatol 2013, Shimada S et al. Clin Exp Rheumatol 2013など)近年のプロテオミクス的手法の発達により、数千種類の蛋白の発現プロファイルを微量の検体からダイレクトに検出できるようになったことから蛋白レベルで皮膚筋炎皮膚特異的分子を検索し病態解明につなげたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、皮膚筋炎の皮疹に特異的に出現する分子をプロテオミクス的手法を用いて、皮膚組織全体あるいは皮膚の各コンポーネントの培養細胞(線維芽細胞および疾患特異的 iPS 細胞から誘導した角質細胞・血管内皮細胞)から同定し、非常に難しいことで知られる本疾患の皮疹からの診断を容易にする事と、病因・病態を解明し難治性疾患である本症の新規治療法を開発する事が目的である。

遺伝情報を司る DNA の転写産物の 95%以上がノンコーディング領域から転写される ncRNA であることが明らかになっている。ncRNA は、主に long ncRNA (lncRNA)と small RNA に大別される。比較的研究が進んでいるのが、miRNA, siRNA, piRNA など 20 塩基前後の small RNA であるのに対し、miRNA より長く 200 塩基以上の長さを有する long non coding RNA (lncRNA)はゲノム中の様々な領域から発現しており、miRNA が転写後の遺伝子の発現を調節する機能を有し、免疫応答、細胞増殖や分化、細胞発生、器官発生、幹細胞と生殖細胞系の増殖、アポトーシス等に関与し、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症など多くの自己免疫疾患との関連が報告されているのに対し、lncRNA は胚の多分化能や分化の調節、体軸方向の形成、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。種類も豊富な lncRNA はようやく研究が広がりを見せつつあり、今後 10 年間で飛躍的に発展することが予想される。

当科において RT-PCR の手法を用いた lncRNA を定量解析できるキットを用いて、正常患者と DM 患者、また皮疹がよく鑑別の対象となり皮膚科で扱うことの多い全身性エリテマトーデス(SLE)、同様に皮膚科で扱うことの多い強皮症患者の血清と皮膚組織を用いて、皮膚筋炎で発現上昇を認める lncRNA をいくつか調べた。その結果、dio3os、NTT の発現上昇を DM 患者の皮疹部組織と血清で認めため(図 3・4) 本研究ではこれらに注目し、とくに lncRNA (dio3os、NTT)の皮膚筋炎における役割を解明することを目的

とする。

図 3

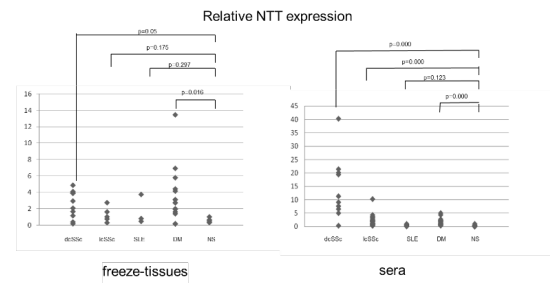
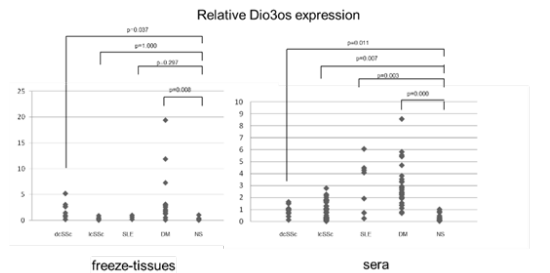


図 4



## 3. 研究の方法

(1)上記検査で症例数を増やし、RT-PCR の手法を用いた lncRNA (長鎖非翻訳 RNA) を定量解析できるキットを用いて、dio3os、NTT の上昇していることを再評価する。

(2)正常・DM 患者の皮膚組織における lncRNA の発現を real time PCR および in situ hybridization を用いて評価。タンパク発現の解析には免疫プロットおよび免疫染色を行い解析する。

(3)分子の機能解析を in vitro および in vivo で行う。

(4)lnc RNA の機能を siRNA により評価する。

(5)lncRNA と DM 患者の臨床所見(皮疹、筋力低下、関節痛、採血異常など)との相関を統計学的に解析する。

皮膚組織の採取; DM 患者の文書による同意を得た後に、診断のために皮疹部皮膚組織から生検された皮膚生検組織を用いて研究を行う。正常対照皮膚としては、年齢・性別が合致した正常人皮膚(植皮の際に余剰となった皮膚)数例を使用する。また対照疾患群として皮膚筋炎と鑑別を要することが多い強皮症・エリテマトーデスや悪性リンパ腫などのサンプルも同時に解析する予定である。

培養細胞からの RNA 抽出と解析; 抽出には miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA)を使用する。具体的には過去の報告に若干の修正を加えた方法として(Kroh EM, et al. Methods 2010)、Qiazol solution を 1ml 添加し vortex にてよく混和した後、5 分放置する。さらにクロロホルムを添加し、vortex にて混和後遠心操作を行う事で水層とフェノール層を分離し、total RNA が含まれた水層のみを RNeasy spin column に通し、microRNA のみを単離する。さらに RNeasy MinElute spin column を用いて microRNA を濃縮精製し、nuclease-free water

を用いて溶出する。次に、total microRNA を Mir-X miRNA First Strand Synthesis and SYBR qRT-PCR Kit (Takara)を用いて cDNA 化し、得られた cDNA を鋳型として Takara Thermal Cycler Dice (TP800) 上で Quantitative real-time PCR を行う。各 microRNA に対応する primer の配列は miRBase を参照して決定する。これらの primer は単一の PCR 産物ができるように条件を設定する。PCR 反応は denaturation (95 °C)5 秒間および annealing (60 °C)20 秒間を 1 サイクルとし、50 サイクル程度を予定する。データの解析は hermal Cycler Dice Real Time System ver2.10B (Takara)ソフトウェア上で行う。PCR 産物の特異性は融解曲線より判断する。目的とする lncRNA の相対濃度を standard curve method を用いて計算し、各サンプルの U6 発現で補正をする。

局在の解析；病変部で発現に差が見られる lncRNA については、in situ hybridization で皮膚組織での局在を検討する。表皮・真皮浸潤細胞・血管あるいは線維芽細胞などでの標的蛋白の発現状況を皮膚筋炎と正常人および他疾患群で比較する。詳しい局在の同定には血管内皮細胞マーカーやリンパ球マーカーなどとの二重染色を施行する予定である(Nakashima T et al. PloS One 2012)。以上の行程により、皮膚筋炎を皮疹から in situ hybridization で診断するためのマーカーを同定できると考える。

in vitro での機能解析；それまでの実験結果を経て同定した皮膚筋炎皮膚特異的分子の機能解析を行い、病態の解明を目指す。まず in vitro で分子の局在に応じたコンポーネントの培養細胞（表皮角質細胞や線維芽細胞あるいは血管内皮細胞など）を用いて、皮膚筋炎で減少している分子については siRNA で分子をノックダウンして細胞に生じる変化を観察する。具体的にはサイトカインや遺伝子発現の変化をアレイにより確認し、あるいは細胞そのものの増殖能や遊走能を比較する予定である。逆に皮膚筋炎で増加している分子についてはレンチウイルスベクターを用いた強発現を行う。

in vivo での機能解析；皮膚筋炎皮膚特異的分子のノックアウトマウス（皮膚筋炎で減少している分子）あるいはトランスジェニックマウス（皮膚筋炎で増加している分子）を作成し、皮膚のフェノタイプとして上記の皮膚筋炎に特徴的な皮疹が出現しないかどうか確認する。

臨床像との関連解析；lncRNA と皮膚筋炎患者の臨床所見（皮疹、筋力低下、関節痛、採血異常など）との相関を統計学的に解析する。

#### 4. 研究成果

上記実験を計画したが研究期間中に有意な結果を得ることが出来ず、研究を継続中である。DM における lnc RNAs の最新の知見として、佐藤ら (Sato T. et al. Novel autoantibodies against 7SL-RNA in

patients with polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 2005;32:1727-33)はPM/DMに關与する lncRNA を signal recognition particle 7SL RNA (7SRNA)であると同定した。彼らは 7SL RNA と 6 個のタンパクからなる SRP (小胞体へのタンパク輸送に關連する物質)に対する自己抗体を有する PM/ DM における 7SL RNA に対する自己抗体の発現を臨床的かつ血清学的に評価した結果、7SL RNA に対する新規の自己抗体の発現は民族的背景、臨床的特徴、発症時期に關していたため、PM/DM の新たな血清学的マーカーになりうる事を示した。さらに、Quing-Lin Peng ら (Sci Rep. 2016 Sep 8;6:32818)はマイクロアレイ解析によって DM における lnc RNAs の転写分析を行い、間質性肺炎を有する DM 患者と Jo-1 抗体をもつ患者とでは lncRNAs の発現のパターンが異なり、中でも I 型 IFN がそれらの調整に關わる最も重要な因子であること、I 型 IFN を発現する遺伝子が筋膜に高度に発現している可能性を示唆している。

分子レベルの研究が進む一方で、臨床においては生物学的製剤が次々と開発され臨床で目覚ましい成果を挙げている。DM に使える新たな新規治療薬は開発されていないものの、DM の鑑別疾患の 1 つとなったり DM とオーバーラップしたりすることのある SLE においては 2017 年末にベリムマブ(可溶性 B リンパ球刺激因子 [BLyS、別名: B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF) 及び TNFSF13B] に選択的に結合し、その活性を阻害する完全ヒト型抗 BLyS モノクローナル抗体製剤)が使用できることとなり、病勢増悪の際の病勢コントロール目的やステロイドおよび免疫抑制剤の減量・中止目的に使用することが可能となり、寛解を目指すことが出来るようになった。またヒドロキシクロキン (HCQ) は皮膚エリテマトーデス (CLE)・SLE・関節リウマチの標準的治療薬で、WHO の指定する必須医薬品の一つでもあるが、日本では 2015 年 7 月に CLE (皮膚型 LE) と SLE が適応症として承認された。HCQ は、抗炎症作用、免疫調節作用、抗マalaria作用、抗腫瘍作用等多岐にわたる作用を有する薬剤である。その分子メカニズムは必ずしも明らかではないが、Toll 様受容体の機能阻害に關連している (Wallace DJ, Gudsoorkar VS, Weisman MH, et al: New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE, Nat Rev Rheumatol, 2012; 8:522-533.)。HCQ は免疫調整剤に分類され、これまで標準的に用いられていたステロイドや免疫抑制剤とは異なり免疫抑制に伴う副作用を心配することなく比較的 safely 使用することが出来る。LE の皮膚症状・倦怠感等の全身症状・筋骨格症状を改善するのみならず、軽度の症状やデータ異常があるために、長期間免疫抑制剤やステロイドを漸減できなかった患者に対し導

入することで、免疫抑制剤やステロイドの漸減が可能となっている。海外では SLE、CLE 以外にも関節リウマチ、皮膚筋炎など広く標準的に使用されているため、今後皮膚筋炎の皮膚症状に対しても使用が拡大することを期待している。DM 患者の皮膚病変にも効果が認められれば皮疹の形成機序に SLE と DM ではなんらかの共通点があることの証明となりさらなる病態の解明も進むであろう。SLE はこの数年間で新たに 2 つの薬剤が登場し患者予後や QOL が大きく改善するものと思われる。しかしながら副作用で使用中断を余儀なくされる患者がいることも事実であり、治療の選択肢は多いに越したことはなく、これからもさらなる病態解明と治療薬の開発が必要である。皮膚筋炎では未だステロイドと免疫抑制剤による治療に頼らざるを得ない状況であるが、関節リウマチや SLE における生物学的製剤の登場に引き続き、JAK 阻害薬など新たな機序の新薬も続々と開発が進んでいる。PM/DM に対する生物学的製剤の開発状況であるが、関節リウマチ治療に革新をもたらした腫瘍壊死因子 (TNF) 阻害薬は効果が一定せず、インターロイキン (IL) - 1 阻害薬は効果がなく現在、IL- 6 阻害薬による臨床試験が米国で予定されているとのことである。同じ米国では、B 細胞除去をもたらすリツキシマブによるランダム化二重盲検試験が行われた。しかし主要評価項目で偽薬と差がつかず、サブ解析によって一部の症例に対する有効性が示唆されたにすぎず、今後その一部に含まれる筋炎特異的自己抗体陽性例に限って臨床試験が行われる可能性もある。CD28 分子を介した刺激を遮断して T 細胞活性化を抑制するアバタセプトは欧州で多施設オープンラベル試験が終了しその有効性が示された(上阪等 臨床リウマチ, 28 : 299 ~ 303, 2016)。このように、様々な生物学的製剤が PM/DM 治療に試されてきており疾患の病因・病態の解明に伴い膠原病領域の治療はさらに進歩を遂げるものと考えられる。

以上、DM における lncRNAs の役割が徐々に解明されてきている一方で、当研究での DM における lncRNAs の役割についてはまだ研究段階であり、これからも DM の病態解明と新規治療の開発に向けて研究を継続する。

#### 5 . 主な発表論文 (計 3 件)

(1) Bromoderma in a pituitary adenoma patient treated with bromocriptine.

Maeda S, Kajihara I, Ogata A, Johno T, Jinnin M, Ihn H. J Dermatol. 2017 May;44(5):e95-e96. 査読有

(2) Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis.

Tanigawa H, Miyata K, Tian Z, Aoi J,

Kadomatsu T, Fukushima S, Ogata A, Takeda N, Zhao J, Zhu S, Terada K, Endo M, Morinaga

J, Sugizaki T, Sato M, Morioka MS, Manabe I, Mashimo Y, Hata A, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M, Araki K, Jinnin M, Ihn H, Oike Y. Sci Rep. 2016 Oct 4;6:34690. doi: 10.1038/srep34690. 査読有

(3) Altered expression of CD63 and exosomes in scleroderma dermal fibroblasts.

Nakamura K, Jinnin M, Harada M, Kudo H, Nakayama W, Inoue K, Ogata A, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H.

J Dermatol Sci. 2016 Oct;84(1):30-39. 査読有

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

緒方 亜紀 (OGATA, Aki)

熊本大学・医学部附属病院 非常勤診療医師

研究者番号 : 80433035