

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16029

研究課題名(和文)エクソソーム解析による尋常性白斑の発症メカニズム解明と新規治療への応用

研究課題名(英文)To Explore the Pathogenesis of Vitiligo Based on the Exosome Analysis

研究代表者

楊 伶俐 (YANG, Lingli)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：40711784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：白斑は皮膚においてメラノサイトが機能的に色素を産生できなくなることによって生じる色素異常症であるが、これまでの研究によりメラノサイト周囲の環境が大きく影響していることがわかってきている。そこで、我々は新たな白斑病態に関与しうる重要な環境因子として細胞外ベシクル(EVs)に着目した。EVsの白斑における関与は不明である。そこで本研究ではEVs等白斑病態に関与しうる重要な環境因子に着目し、その制御を切り口として白斑部メラノサイトの健常化を目指すマイクロアレイ解析によって、白斑患者の皮膚水泡液中EVs内miRNA、核小体低分子RNA(snoRNA)を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尋常性白斑病変部位の皮膚組織に焦点を当て、病変、非病変および健常人表皮からの吸引水疱より得られた水疱内容液を用いる新しい実験法を考え、網羅的に解析を行った。これらの研究手法は、尋常性白斑病態解明に関する研究の中で今までないアイデアである。このようなプロセスと視点から研究を進めることにより、尋常性白斑だけでなくこれまで不明とされる皮膚科疾患の病態解明に繋がる新たなアプローチとなる。

研究成果の概要(英文)：Vitiligo is an acquired pigmentary disorder characterized by the loss of skin color and functional melanocytes. The pathogenesis of vitiligo remains unclear. Exosomes are nanosized extracellular vesicles that originate from endosomes and are secreted by most cells into the extracellular space. They serve as mediators of intercellular communication and have been implicated in the regulation of several physiological and pathological processes. In this study, we investigate the association of exosomes with vitiligo and performed comprehensive analyses of exosomes in suction blister from lesion skin and nonlesion lesion from patients with vitiligo and healthy control. An improved understanding of the involvement and role of exosomes may help to elucidate the pathogenesis of vitiligo and lead to the development of potential diagnostic markers and therapeutic options.

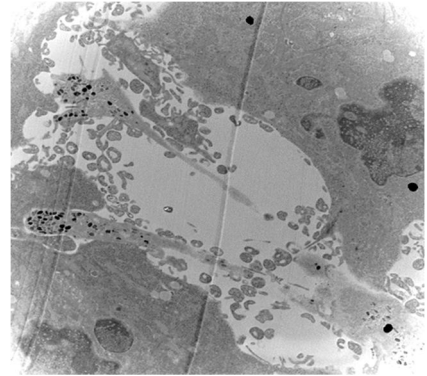
研究分野：皮膚科学

キーワード：色素細胞 エクソソーム メラノサイト 尋常性白斑

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

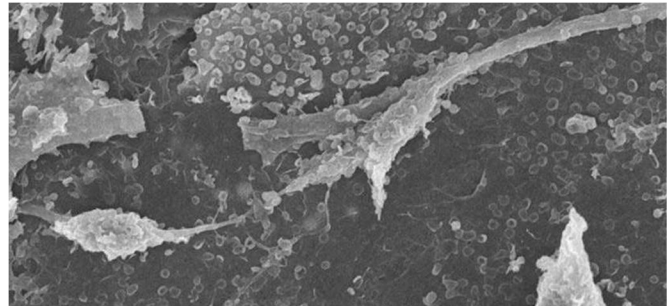
尋常性白斑は、皮膚の色を作っている色素細胞(メラノサイト)が消失することにより発症するが、メラノサイトの表皮内へ遊走、定着、機能の異常やメラノサイトの消失機序に関して、解明すべき点が多く残されている。最近、尋常性白斑の新たな標的として、色素細胞とその周辺細胞(主にケラチノサイト)および周辺環境で構築される「表皮色素細胞ニッチ;表皮内微小環境」が注目されている。尋常性白斑の病変部で、表皮細胞の接着因子 E-cadherin 発現の低下 (Wagner RY, et al. *J Invest Dermatol.* 2015;135(7):1810-1819) や局所のケモカイン CXCL9, CXCL10 の上昇 (Strassner JP, et al. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(5):847-855), また miR-211 の高発現 (Sahoo A, et al. *J Invest Dermatol.* 2017;137(9):1965-1974) など、表皮内微小環境の変化が尋常性



(図1)

白斑に関わっているといった報告が相次いでいる。

申請者らは、正常ヒト皮膚表皮ケラチノサイトとメラノサイトの共培養細胞を電子顕微鏡(透過電顕:図1;走査電顕:図2)で観察したところ、インタクトな細胞外ベジクルが大量に存在していることを見出した。現



(図2)

在まで、このような細胞外ベジクルの生理機能や病的意義などに関し謎が多く、これからの解明が必須である。

細胞外分泌小胞 (Extracellular Vesicles, EVs) は、ほとんど全ての哺乳類細胞から細胞外に放出される、極めて小さな小胞体であるが、その実体については不明な部分が多い。一方、生体内の様々な生命現象や疾患は、細胞が互いにコミュニケーションとすることで誘導される。その細胞間の情報伝達機構として、表面タンパク質を介する経路やサイトカイン、ケモカインなどを介した伝達機構が活発に研究されてきたが、近年、細胞から分泌される小型膜小胞のエクソソームが注目を浴びている。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた直径 30 ~ 100nm の細胞外ベジクルであり、内部には、分泌細胞由来の mRNA、microRNA や、タンパク質、脂質が存在し、分泌細胞とその標的細胞の間で mRNA、microRNA、タンパク質、脂質などを交換する重要なメッセンジャーであることが明らかとなりつつある (Raposo G, et al. *J. Cell Biol.* 2013(19): 43-51.)。エクソソームが新規の細胞間情報伝達手段として注目を集めており、ここ数年でがん微小環境の形成、がんの進展や転移にエクソソームが関わっている報告がなされていると同時に、他の疾患にも関与していることが続々と明らかになっている。さらに、エクソソームを利用した疾患の早期診断、治療法の開発も急速に進んでいる。

2. 研究の目的

皮膚科で最も難治な疾患の一つである尋常性白斑におけるエクソソームの研究は皆無である。

ケラチノサイトとメラノサイト細胞間のコミュニケーションが、メラノサイトの恒常性、細胞死と生存に重要な役割を担っていることは周知の事実であり、このコミュニケーションの一役にエクソソームが担っている可能性が考えられる。そこで、本研究の目的は尋常性白斑の病態形成へのエクソソームの関与に着目し、標的因子同定及び新規治療への応用に繋げる事である。

3．研究方法

尋常性白斑の病態形成におけるエクソソームの役割を解明する事を目的し、臨床検体を用いてアプローチする予定である。

尋常性白斑患者病変部位から皮膚サクシオンプリスター液の解析

本研究に書面にて同意が得られた尋常性白斑患者（白斑病変部、健常部）および同年代健常人の皮膚を注射筒吸引装置で皮膚面を陰圧に 2~4 時間程度持続し、表皮水泡（サクシオンプリスター）を作成する。注射針でサクシオンプリスター液だけを回収し、Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher 社)によりエクソソームを濃縮、回収する。得られたエクソソームをエクソソームマーカー（CD63、Alix、Tsg101 など）に対する抗体を用いて同様にウェスタンブロッティング、この画分を電子顕微鏡で観察し、直径 30~100nm の二重膜顆粒であることを確認する。確認されたエクソソームについて、Total Exosome Isolation Kit(Thermo Fisher 社)を用いて抽出と精製を行う。得られた miRNA は、網羅的比較定量解析を行う。

4．研究成果

微量な白斑患者検体から EVs を収率良く抽出し、その内包物を解析するため、まず EVs の抽出方法を検討し、Characterization を行った。さらにその内包物の miRNA の精製方法を検討した。EVs の抽出は、培養細胞上清を用いて Total Exosome isolation Reagent (Invitrogen)、MagCapture™ Exosome Isolation Kit (Wako)、EVSecondL70 (GL Sciences) を比較し、EVs マーカー CD9 のウェスタンブロッティングの結果、Nanosight の結果より精製度は MagCapture、EVSecondL70 がより高く、収率は EVSecondL70 が最も高いことが確認された（図 3A,B,C）。また透過型電子顕微鏡によって 100 nm 前後の膜小胞が確認された（図 3D）。次に、白斑患者から EVs 内 miRNA を精製するため、白斑の外科的治療の際に作成される表皮水泡中の液体（SBT 液）を大阪大学医学部皮膚科、しばた皮膚科クリニックより提供を受けた。上記最適化した方法にて、4 人の尋常性白斑患者の健常部及び白斑部の SBT 液から EVs 中 RNA を抽出した。同容量の SBT 液から抽出した EVs 内 RNA 量は有意に白斑部で減少していた（図 4）。またこれら RNA をマイクロアレイ解析したところ、健常部と白斑部で発現量の異なる 11 個の miRNA と 5 個の核小体低分子 RNA (snoRNA) が同定された（表 1）。

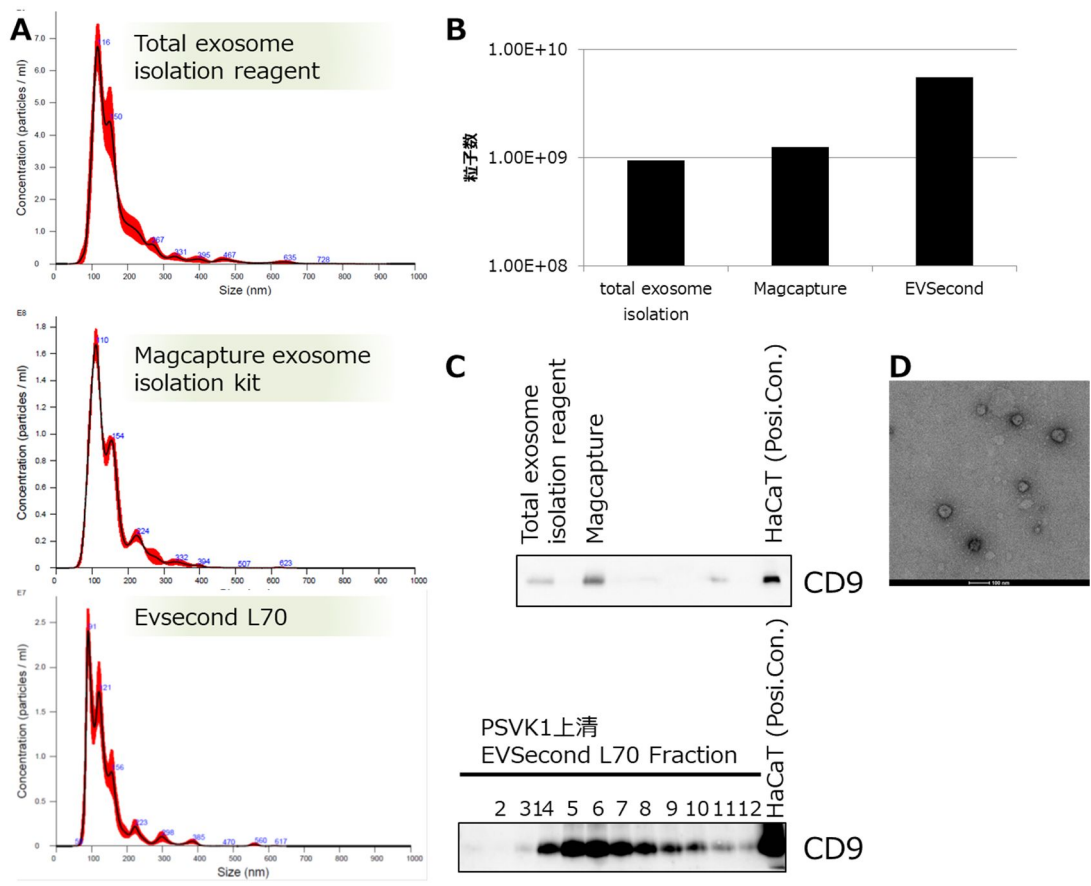


図3. EVsのCharacterizationと抽出方法比較

- A. Nanosight による粒子サイズと濃度分布測定
- B. 細胞培養上清 2 mL から抽出された総粒子数
- C. 各抽出方法で得られた EVs タンパクの CD9 ウェスタンブロッティング
- D. Magcapture で抽出された EVs の電子顕微鏡像

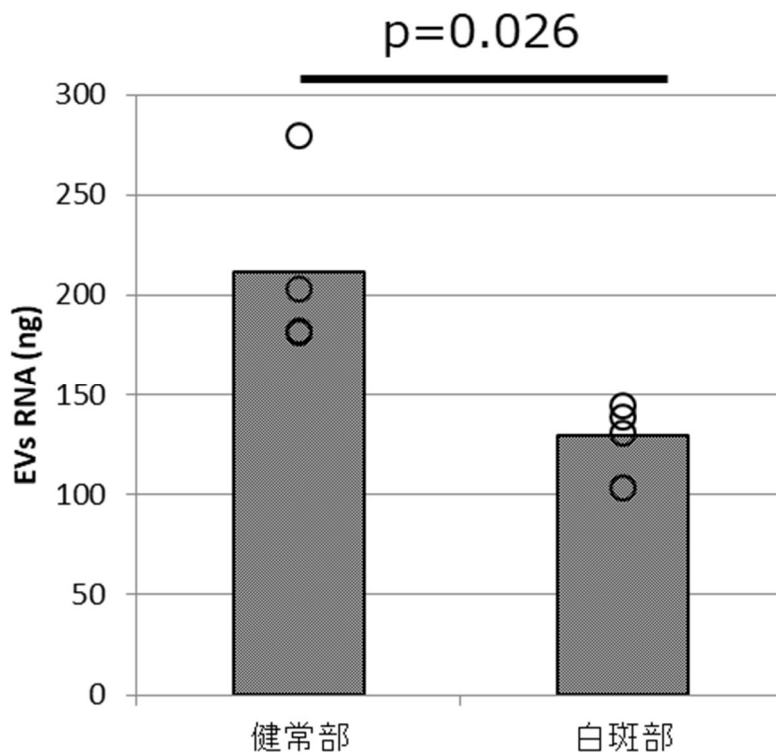


図4. 同容量の SBT 液から抽出した Exosome RNA

表 1 健常部と白斑部で発現量の異なる miRNA と snoRNA

	健常部 < 白斑部	健常部 > 白斑部
hsa-miR-6750-5p		
hsa-miR-6783-5p		
hsa-miR-7110-5p		
hsa-miR-4481		
hsa-miR-3201		
hsa-miR-1263	miRNA	
hsa-miR-3613-3p		
hsa-miR-3928-5p		
hsa-miR-4668-5p		
hsa-miR-6716-3p		
hsa-miR-8084		
ENSG00000238433	snoRNA	
ENSG00000252277	snoRNA	
HBII-85-26	snoRNA	
HBII-85-6	(CDBox)	
HBII-85-8		

マイクロアレイ解析によって、白斑患者の皮膚水泡液中 EVs 内 miRNA、核小体低分子 RNA (snoRNA) を解析した。白斑患者の白斑部と健常部を比較したところ、変動している 13 の miRNA、5 つの snoRNA を同定した。今年度は、まず mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) という miRNA のターゲット遺伝子を in silico 予測するツールを用いて、同定した 13 の miRNA の色素産生、白斑に関係する遺伝子のターゲット予測を行った。結合予測は信頼度のスコアとして、Top 1%を Very High、Top 5%を High、Top1/3 を Medium、Bottom 2/3 を Low として判定される。その結果、多くは Medium もしくは Low であったが、MITF に対しては miR-3201、3613-3p が、TYR に対しては miR-4668-5p が、SCF に対しては miR-4668-5p が、CXCL16 に対しては miR3613-3p が、E-Cad に対しては miR-4668-5p が High のスコアであった。(表 2) miR-6724 に関しては Database に情報がなく、判定できなかった。

表 2 白斑関連 EV 内 miRNA の mirDIP による in silico ターゲット予測

miRDIPIによるTarget予測																		
miR	MITF	TYR	TYRP1	DCT	SCF	ET-1	TNFa	TGFb	CXCL9	CXCL10	CXCL16	CCL20	IL-1b	IL-6	GM-CSF	MSH	MSH/ACTH	E-Cad
1263	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium
1915-3p	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium
3201	High	Low以下	Low以下	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium
3613-3p	High	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	High	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Low以下	Medium
3928-5p	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Medium
4481	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Medium
4668-5p	Medium	High	Medium	Medium	High	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Medium	High
6716-3p	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下
6724	Not in Database																	
6750-5p	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Medium	Low以下	Low以下
6783-5p	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Medium	Low以下
7110-5p	Medium	Medium	Low以下	Medium	Low以下	Medium	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下
8084	Medium	Medium	Medium	Low以下	Medium	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Low以下	Low以下	Medium	Medium	Low以下	Low以下	Medium	Low以下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楊 伶俐
2. 発表標題 エクソソーム解析による白斑病態解明の新たなアプローチ
3. 学会等名 第4回白斑・白皮症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----