

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17005

研究課題名（和文）ケロイド線維芽細胞における lncRNA の機能解析

研究課題名（英文）Expression profiles of lncRNA in keloid fibroblasts

研究代表者

青木 雅代（Aoki, Masayo）

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：40465282

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）：難治性の皮膚線維性病変であるケロイドの線維芽細胞で、長鎖ノンコーディングRNAを網羅的に解析した。細胞外マトリックスを分解する酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1, 3の遺伝子発現がケロイドで低下しており、これらの酵素が位置する染色体11q22.2付近にコードされるlncRNAに絞りこんで解析を行った結果、LINC00900の発現上昇（5.9倍）が確認された。LINC00900は、線維性疾患において何らかの機能を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

lncRNAは、タンパクをコードしないものの、生体の様々なプロセスに関与する。しかし、大部分のlncRNAの機能は未だ不明である。今回の研究課題で、これまで少なかったケロイド線維芽細胞（継代0代）における遺伝子発現プロファイルを構築することができた。これにより、ケロイドに関与する機能性lncRNA研究の発展が期待される。さらに、他の臓器の線維性疾患における機能性lncRNA研究への応用や、未だ機能が不明であるlncRNAの機能特定に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Long non-coding RNA was comprehensively analyzed in keloid fibroblasts, which are intractable cutaneous fibrotic lesions. The gene expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1,3, which is an enzyme that degrades extracellular matrix, is decreased in keloids. lncRNA encoded near chromosome 11q22.2, where these enzymes are located, was analyzed. The increased expression of LINC00900 (5.9-fold) was confirmed. It was suggested that LINC00900 has some function in fibrotic diseases.

研究分野：医学

キーワード：lncRNA ケロイド 細胞外マトリックス 線維芽細胞 マトリックス分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ケロイド・肥厚性癬痕は、皮膚に生じる炎症性線維性病変である。未だ発生と拡大のメカニズムが不明であり、手術や放射線療法、ステロイドによる治療の有効性は限定的である。異常蓄積した細胞外マトリックスを効果的に分解させる手段が模索される。核酸送達ターゲットを確実に絞ることができ、効果も出やすい。研究代表者は、siRNA を利用した抗線維化核酸治療薬の開発に取り組んできた(Aoki et al. J Invest Dermatol 2014; Aoki et al. Mol Ther-Nucleic Acids 2020)。

(2) 近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA のうち約 200 塩基以上の長さを持つ lncRNA が、転写、翻訳、エピジェネティクスなど生体内の多様なプロセスに関与することが明らかになりつつある。しかし、大部分の lncRNA の役割は未だ不明である。今後、lncRNA の機能を明らかにするために、様々な観点からの解析を進めることが望まれ、新たな治療ターゲットとして期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、細胞外マトリックス代謝に関与する新たな lncRNA の機能を特定し、ケロイド・肥厚性癬痕治療の新たなターゲットと戦略を提唱することである。

(2) 具体的なアプローチとして、ケロイド線維芽細胞において、細胞外マトリックス代謝に関与する分子と相関を示す lncRNA を特定する。ターゲット lncRNA の細胞外マトリックス代謝におけるメカニズムを明らかにする。ケロイド線維芽細胞を用いてターゲット lncRNA を抑制し、治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 初代線維芽細胞における lncRNA マイクロアレイを用いた網羅的解析
ヒト正常皮膚およびケロイド組織より初代線維芽細胞を、explant 法にて培養する。継代 0 代で細胞を回収し、total RNA を分離する(n=3)。マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。lncRNA 解析を行う。ケロイド線維芽細胞において、ECM 代謝に関与するコラーゲンタイプ 1、タイプ 3、matrix metalloprotease(MMP)、tissue inhibitor of metalloprotease(TIMP)などの発現と、強い相関を示す lncRNA をいくつか抽出する。リアルタイム RT-PCR により検証を行う(n=4-6)。有意な発現差を確認したものの中から、ターゲット lncRNA を決定する。

(2) ターゲット lncRNA の線維芽細胞におけるメカニズムを in vitro で解析する
正常皮膚線維芽細胞を培養する。ターゲット lncRNA を発現するプラスミドを構築する。プラスミド(コントロールベクター vs ターゲット lncRNA 発現ベクター)を、細胞に導入する。ECM 代謝関連因子群の mRNA 発現を比較する。

4. 研究成果

(1) ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NF) およびケロイド線維芽細胞 (KF) 継代 0 代 (P0) を培養した。マイクロアレイ法を用いて、遺伝子発現解析と lncRNA 解析を網羅的に行った (n=2)。細胞外マトリックス分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-1, 3, 7, 10 が発現低下を示しており、線維化の進行に関与すると考えられた (図 1)。

	A	B	C	G	H	I	J	K	T
1				P-value ([KF] vs [NF])		FoldChange			
	ProbeName	GeneSymbol	GeneName	p (Corr) ([KF] vs [NF])	p ([KF] vs [NF])	FC ([KF] vs [NF])	Log FC ([KF] vs [NF])	Regulation ([KF] vs [NF])	Chromosome Number
2									
3	A_23_P13094	MMP10	matrix metalloproteinase 10	0.93	0.28	-12.32	-3.62	down	chr11
4	A_23_P161698	MMP3	matrix metalloproteinase 3	0.93	0.26	-7.32	-2.87	down	chr11
5	A_23_P52761	MMP7	matrix metalloproteinase 7	0.93	0.35	-9.30	-3.22	down	chr11
6	A_23_P40174	MMP9	matrix metalloproteinase 9	0.93	0.32	-9.44	-3.24	down	chr20
7	A_23_P1691	MMP1	matrix metalloproteinase 1	0.93	0.24	-4.37	-2.13	down	chr11

図 1 マイクロアレイによるマトリックスメタロプロテアーゼの発現の差

(2) これらのマトリックスメタロプロテアーゼが位置する染色体 11q22.2 付近に位置する lncRNA に絞りこんで解析を行った。正常皮膚線維芽細胞と比較して、ケロイドで発現変動の大きい lncRNA を抽出したところ、H19 と LINC00900 がそれぞれ 23 倍、7 倍の発現上昇を示した (図 2)。

ProbeName	GeneSymbol	GeneName	GO biological process	GO cellular component	GO molecular function	Chromosome Number_Avadis	FC ([KF] vs [NF])
A_19_P00323082	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript				chr11	23.22
A_24_P52697	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript				chr11	21.69
A_21_P0000646	LINC00900	long intergenic non-protein coding RNA 900				chr11	7.32
A_21_P0000631	LOC643733	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase				chr11	3.96
A_22_P00017754	lnc-YIF1A-6	lnc-YIF1A-6:1				chr11	5.28
A_21_P0007462	lnc-CPSF7-1	lnc-CPSF7-1:1				chr11	4.88
A_21_P0007369	lnc-PDE2A-1	lnc-PDE2A-1:1				chr11	3.96
A_22_P00006233	lnc-FAM55B-1	lnc-FAM55B-1:1				chr11	3.88
A_23_P396299	MRV1-AS1	MRV1 antisense RNA 1				chr11	3.79
A_22_P00002306	MIR210HG	MIR210 host gene (non-protein coding)				chr11	3.74
A_21_P0007288	lnc-SORL1-1	lnc-SORL1-1:1				chr11	3.48
A_22_P00011365	lnc-P2RX3-1	lnc-P2RX3-1:1				chr11	3.28
A_32_P189790	DKFZp779M0652	uncharacterized DKFZp779M0652				chr11	3.26
A_21_P0007204	LOC101928812	uncharacterized LOC101928812				chr11	3.02
A_22_P00011597	RAB30-AS1	RAB30 antisense RNA 1 (head to head)				chr11	2.95
A_21_P0007245	lnc-USP35-10	lnc-USP35-10:1				chr11	2.92
A_22_P00010107	lnc-MRGPRF-1	lnc-MRGPRF-1:1				chr11	2.90

図2 マイクロアレイによる染色体 11 における lncRNA 発現の差

(3) 次に、定量的 RT-PCR によるマイクロアレイ結果の検証を行った (n=9)。MMP については、MMP-1 および 3 で、有意な発現低下が確認された。H19 に有意差は認めず、LINC00900 において有意な発現上昇が確認された (図 3、4)。

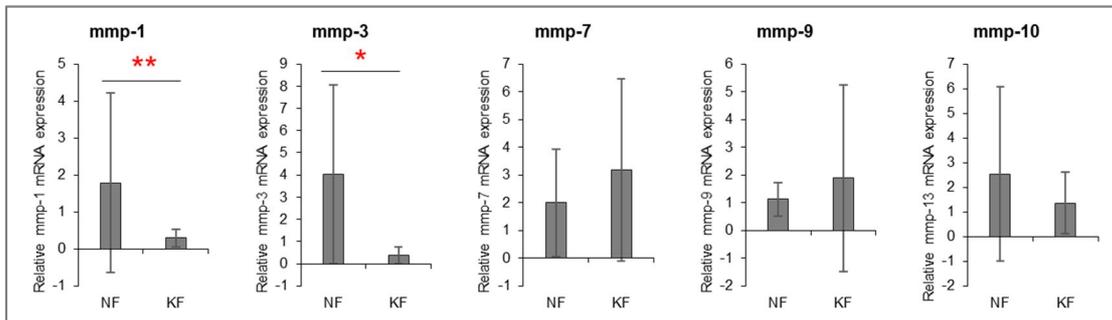


図3 定量的 RT-PCR によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現の検証

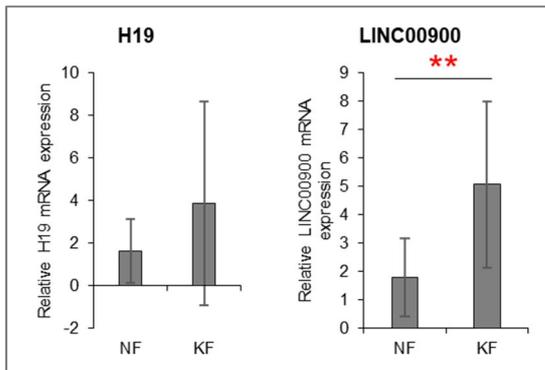


図4 定量的 RT-PCR による lncRNA の発現の検証

(4) 次に、LINC00900 全長を PCR にて増幅し、プラスミドベクター pcDNA3.1 に組み込んだ。ヒト真皮由来正常線維芽細胞 (NHDF) に遺伝子導入した。しかし、LINC00900 の過剰発現による MMP の発現制御は確認できなかった (図 5)。

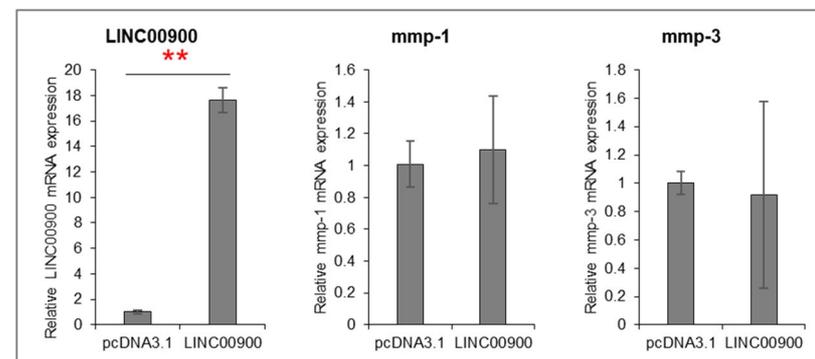


図5 LINC00900 の過剰発現と mmp-1, -3

(5) 今回の研究課題で、初代ケロイド線維芽細胞 (継代 0) における遺伝子発現プロファイルを構築することができた。これにより、線維化に關与する lncRNA 研究の発展が期待される。

LINC00900 の機能の特定には至っておらず、次のステップとして、KF への遺伝子導入実験や siRNA による抑制実験などにより機能解析を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aoki M, Aoki H, Mukhopadhyay P, Katsuta E, Takabe K	4. 巻 139
2. 論文標題 The roles of sphingosine kinases in skin aging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 951-953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.06.192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Aoki M, Matsumoto NM, Okubo Y, Ogawa R	4. 巻 126
2. 論文標題 Cytochrome P450 genes play central roles in transcriptional response by keratinocytes to a high-voltage alternating current electric field.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioelectrochemistry	6. 最初と最後の頁 163-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioelechem.2018.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoki M, Aoki H, Mukhopadhyay P, Tsuge T, Yamamoto H, Matsumoto NM, Toyohara E, Okubo Y, Ogawa R, Takabe K	4. 巻 20
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate facilitates skin wound healing by increasing angiogenesis and inflammatory cell recruitment with less scar formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20143381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuge T, Aoki M, Akaishi S, Dohi T, Yamamoto H, Ogawa R	4. 巻 167
2. 論文標題 Geometric analysis and a retrospective cohort study on the usefulness of fascial tensile reductions in severe keloid surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 504-509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2019.07.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki M, Kondo A, Matsunaga N, Honda A, Okubo Y, Takabe K, Ogawa R	4. 巻 2020
2. 論文標題 The immunosuppressant fingolimod (FTY720) for the treatment of mechanical force-induced abnormal scars.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 7057295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/7057195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoki Masayo, Matsumoto Noriko M., Dohi Teruyuki, Kuwahawa Hiroaki, Akaishi Satoshi, Okubo Yuri, Ogawa Rei, Yamamoto Hirofumi, Takabe Kazuaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Direct Delivery of Apatite Nanoparticle-Encapsulated siRNA Targeting TIMP-1 for Intractable Abnormal Scars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 50 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2020.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Aoki M, Tsuge T, Aoki H, Mukhopadhyay P, Yamamoto H, Matsumoto NM, Toyohara E, Ogawa R, Takabe K
2. 発表標題 Sphingosine-1-Phosphate Enhances Both Excisional and Burn Wound Healing with Less Scarring.
3. 学会等名 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayo Aoki, Noriko M Matsumoto, Azusa Honda, Yuri Okubo, Rei Ogawa, Hirofumi Yamamoto, Kazuaki Takabe, and, Takashi Okada
2. 発表標題 Apatite Nanoparticle-encapsulated siRNA Targeting Tissue Inhibitor of Metalloprotease-1 for the Treatment of Hypertrophic Scars and Keloids
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuge T, Aoki M, Akaishi S, Dohi T, Yamamoto H, Ogawa R
2. 発表標題 Geometric Analysis and a Retrospective Cohort Study on the Usefulness of Fascial Tensile Reductions in Severe Keloid Surgery.
3. 学会等名 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kondo A, Aoki M, Matsunaga N, Honda A, Okubo Y, Takabe K, Ogawa R
2. 発表標題 Topical Injection of the Immunosuppressant Fingolimod (FTY720) Inhibits Mechanical Force-induced Hypertrophic Scarring.
3. 学会等名 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Virginia Commonwealth University	Roswell Park CCC	