

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17807

研究課題名(和文)皮膚線維化におけるPMEPA1の発現と病態形成関与の検討

研究課題名(英文)Analysis for PMEPA1 expression in the pathogenesis of dermal fibrosis

研究代表者

渡邊 友也(WATANABE, Tomoya)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00733461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト皮膚線維芽細胞及び皮膚検体におけるPMEPA1のmRNA及び蛋白の発現を解析したところ、TGF- $\beta$  刺激により経時的かつ有意な発現上昇を認めた。皮膚線維化の代表疾患である全身性強皮症患者由来の線維芽細胞と健常人ではmRNAの発現に差はなく、皮膚検体の免疫染色でも同様の結果であった。また、全身性強皮症患者由来の線維芽細胞のPMEPA1をノックダウンをしたところ、皮膚線維化関連遺伝子の発現に有意な変化は認めなかった。一方で、創傷治癒モデルマウスを用いた解析では、創傷部のPMEPA1の発現上昇を認めており、PMEPA1は創傷治癒過程の線維化病態に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は皮膚線維化におけるPMEPA1の病態関与について解析し、PMEPA1が創傷治癒過程における線維化に関連していることを示した。一方で、全身性強皮症のような線維化が完成された病態においては、PMEPA1の発現に変化がないことから、PMEPA1は創傷治癒などの初期の線維化病態に関与している可能性が示唆された。このTGF- $\beta$  によって誘導されるPMEPA1の更なる機序を解析することで、皮膚における病的線維化の病態解明と治療に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of PMEPA1 mRNA and protein in human skin fibroblasts and skin samples. The expression of PMEPA1 was significantly increased time-dependently by TGF- $\beta$  stimulation. However, there was no difference in mRNA expression between skin fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis(SSc) and normal skin fibroblasts. The immunohistochemistry showed similar results. In addition, knockdown of PMEPA1 using siRNA in SSc skin fibroblasts showed no significant changes in the expression of skin fibrosis-related genes. On the other hand, analysis using a mouse model of wound healing showed increased the expression levels of PMEPA1 in skin ulcer. These results suggested that PMEPA1 is involved in the pathogenesis of skin fibrosis during the wound healing process.

研究分野：皮膚線維化

キーワード：皮膚線維化 全身性強皮症 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎や肝硬変を始めとした臓器の線維化とそれに伴う臓器不全を引き起こす線維化疾患は、先進国における死亡の約 45% を占めることが報告されている (Wynn et al. *J Clin Invest.* 2007)。線維化の詳細なメカニズムは未だ不明な点も多いが、細胞外マトリックスを過剰産生する線維芽細胞の持続活性が病態の中心とされ、細胞外マトリックスの合成系及び分解系の双方が関与し、繰り返す慢性炎症や上皮障害などにより両者のバランスが崩れ、過剰な線維化を引き起こすと考えられている (Kalluri et al. *Curr Opin Nephrol Hypertn.* 2000)。

PMEPA1 は、前立腺細胞でアンドロゲンやその誘導体によって発現が亢進するタンパク質として同定され (Xu, L.L. et al. *Genomics.* 2010)、その後 PMEPA1 が TGF- $\beta$  の直接の標的遺伝子であることが明らかにされた (Watanabe et al. *J. Biol. Chem.* 2010)。それ以外にも PMEPA1 が TGF- $\beta$  I 型受容体 activin receptor-like kinase 5 の分解、オートファジー形成、アンドロゲン受容体シグナル制御分子として関与することが報告されており、マルチシグナル制御分子として、細胞の恒常性維持に作用している。また、PMEPA1 は癌領域においても盛んに研究が行われており、大腸癌、乳癌、肺癌などで、その発現が亢進するとともに、TMEPA1 の発現減少が癌細胞の増殖や転移能を減少させることから癌進展に関与することが報告されている (Nguyen et al. *Cancer Sci.* 2014)。

本研究者は皮膚・肺における線維化機序の解析を試験管内系やヒト皮膚による Ex vivo 実験系を用いて専門的に行ってきた。我々が用いるヒト皮膚の Ex vivo 実験系は血流こそないものの、実際の生体皮膚構造を維持しており、マウスモデルや線維芽細胞を用いた in vitro 実験系と比較して、よりヒトに近い状態を反映していると考えられている (Yasuoka et al. *Open Rheumatol J.* 2008)。そのため、この実験系と細胞内に含まれる RNA 分子を網羅的かつ定量的に解析可能な RNA-seq を組み合わせることによって、TGF- $\beta$  刺激によって制御される複数の新規線維化関連遺伝子を見出し、その中でも特に高い発現を示した PMEPA1 に着目した (Watanabe et al. *Genes.* 2019)。

### 2. 研究の目的

皮膚線維化における PMEPA1 の病態形成における役割とその機能を解析することで、線維化の新規治療法応用への基盤を構築することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### ヒト皮膚検体、ヒト線維芽細胞における PMEPA1 発現解析

ヒト皮膚検体を用いて PMEPA1 の発現を検討し、PMEPA1 が線維化病態に関わる可能性を最初に検討する。ヒト皮膚検体及び健常人由来の線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激し、48 時間後の mRNA と 72 時間後のタンパクの発現を解析した。また TGF- $\beta$  刺激後の経時的な変化についても解析を行った。

#### 他の線維化促進因子による PMEPA1 発現の変化解析

TGF- $\beta$  は線維化を誘導する代表的な因子であるが、PMEPA1 が TGF- $\beta$  以外の線維化促進によって誘導されるかは不明であるため PMEPA1 の発現誘導は TGF- $\beta$  特異的か否かを確認するために、TGF- $\beta$  以外の既に知られている線維化促進因子である Bleomycin で刺激し、PMEPA1 の発現を解析した。

#### 線維化疾患の線維芽細胞における PMEPA1 発現解析

全身性強皮症は皮膚の真皮に線維化を特徴とする代表的な線維化疾患である。この全身性強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞における PMEPA1 の mRNA 及びタンパクレベルを解析し、健常人由来の皮膚線維芽細胞の発現と比較した。また健常人と全身性強皮症患者の皮膚検体を、免疫染色を用いて解析した。

#### PMEPA1 の機能的解析

線維化に対する PMEPA1 の影響を解明するために、PMEPA1 の siRNA を用いて、全身性強皮症由来の線維芽細胞の PMEPA1 をノックダウンすることによって、線維化促進遺伝子 (Collagen, FN, CTGF, ACTA2 など) や抗線維化遺伝子 (MMP1, MMP3, HGF など) の変化を解析した。

#### 創傷治癒モデルマウスを用いた PMEPA1 の発現解析

マウス背部皮膚に円形皮膚全層欠損潰瘍を作成し、創傷治癒過程を観察するとともに経時的に創傷部の皮膚を採取し、PMEPA1 の発現を解析した。

### 4. 研究成果

### ヒト皮膚検体、ヒト線維芽細胞における PMEPA1 発現解析

TGF- 刺激 48 時間でヒト皮膚検体及びヒト線維芽細胞において PMEPA1 の発現は有意に上昇していた。また、タンパクの発現も mRNA 同様に TGF- 刺激 72 時間で有意に発現が上昇していた (図 1)。

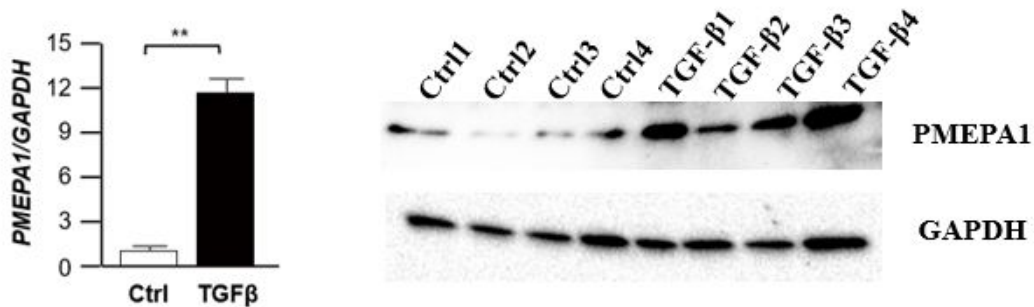


図 1. *In vitro* ヒト皮膚線維芽細胞での PMEPA1 発現解析

また、TGF- 刺激後の経時的な変化を解析したところ、刺激後 8 時間と比較的早期に PMEPA1 の発現が有意に上昇していた (図 2)。

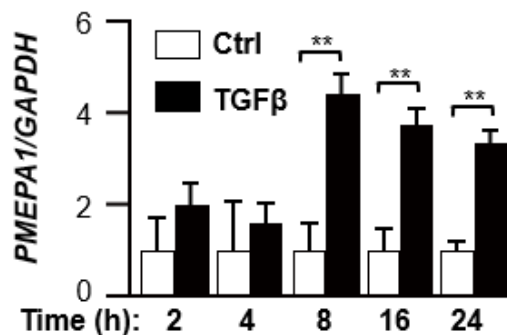


図 2. *Ex vivo* ヒト皮膚検体での経時的な変化

### 他の線維化促進因子による PMEPA1 発現の変化解析

代表的な線維化促進因子である Bleomycin で *Ex vivo* ヒト検体と線維芽細胞で刺激し、48 時間後の PMEPA1 の発現を解析したところ、TGF- 刺激で有意な発現の上昇を認めたが、Bleomycin 刺激では誘導されなかった (図 3)。これらの結果から PMEPA1 の発現誘導は TGF- 特異的であることが分かった。

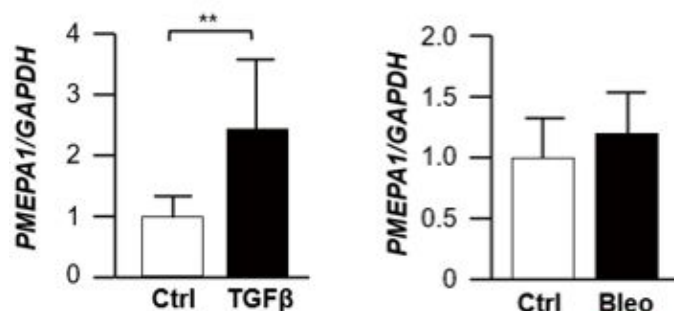


図 3. *Ex vivo* ヒト皮膚検体での PMEPA1 発現解析 at 48h

### 線維化疾患の線維芽細胞における PMEPA1 発現解析

全身性強皮症患者由来の皮膚線維芽細胞における PMEPA1 の mRNA 及びタンパクレベルを解析したところ、mRNA では、病変部分 (SSc-Aff) と非病変部分 (SSc-Un) とともに SSc で若干発現が高い傾向があったものの、有意差は認めなかった (図 4 左)。また、皮膚免疫染色の解析においては、SSc 検体では真皮の線維芽細胞での発現上昇がみられた (図 4 右)。

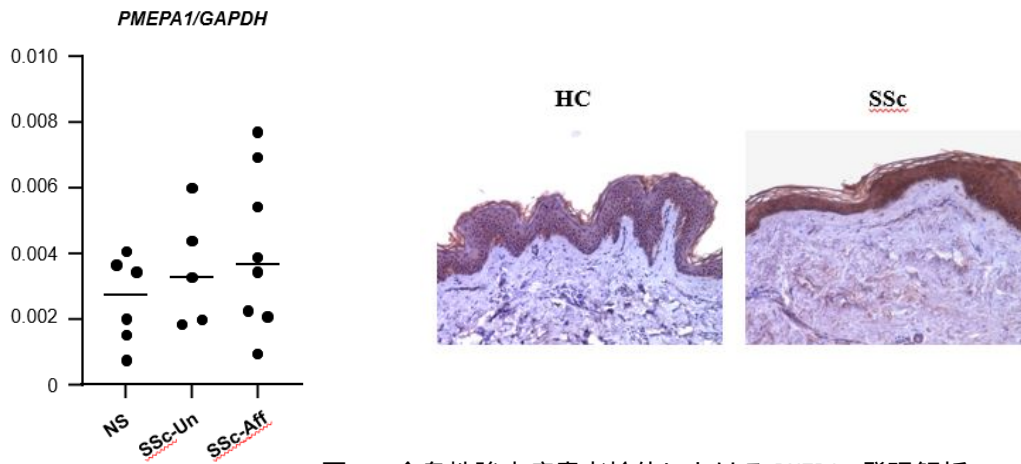


図 4. 全身性強皮症患者検体における PMEPA1 発現解析

#### PMEPA1 の機能的解析

PMEPA1 の病態形成への関与を明らかにするため全身性強皮症由来の線維芽細胞の PMEPA1 をノックダウンし、線維化促進遺伝子 (Collagen、FN、CTGF、ACTA2 など) や抗線維化遺伝子 (MMP1、MMP3、HGF など) の変化を 48 時間後 (mRNA) と 72 時間後 (蛋白) に解析したところ、コントロール群とノックダウン群でこれらの発現に有意差は認めなかった。以上の結果から、PMEPA1 は全身性強皮症の病態形成 (少なくとも皮膚硬化完成期) への関与は少ない可能性が示唆された。

#### 創傷治癒モデルマウスを用いた PMEPA1 の発現解析

上記の結果から、全身性強皮症においては病態の関与ははっきりとしなかったものの、*In vitro* においては TGF- $\beta$  刺激で比較的早期に発現が上昇することが明らかになった。そのため、全身性強皮症のような完成された病態では PMEPA1 の病態への関与は少ないものの、創傷治癒の早期病変への関わりについて検討するため、マウス背部皮膚に円形皮膚全層欠損潰瘍を作成する創傷治癒モデルマウスを作成し、創傷治癒過程を観察するとともに経時的 (Day0, Day3, Day7, Day14) に創傷部の皮膚を採取し、PMEPA1 の発現を解析した。その結果、Day3, Day7 の潰瘍部において PMEPA1 の発現は mRNA・タンパクともに発現が上昇し、治癒後の Day14 では発現が低下していることが分かった (図 5)。以上の結果から PMEPA1 は創傷治癒過程において、病態への関与が示唆された。

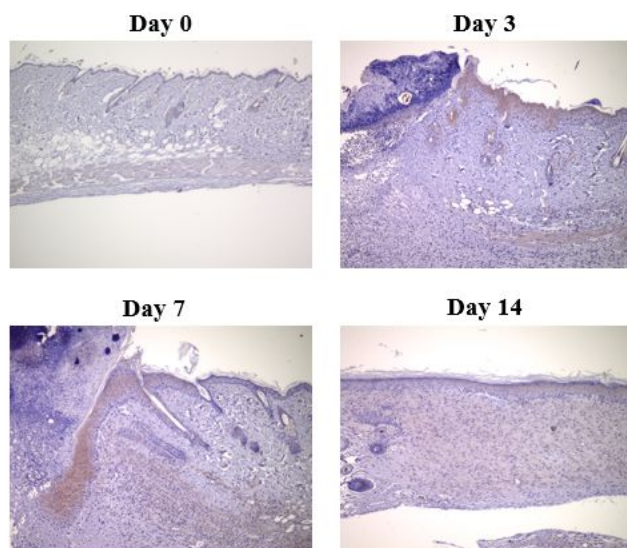


図 5 . 潰瘍部における PMEPA1 の発現

#### 5 . 主な発表論文等

なし (データがまとまり次第投稿予定)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------