

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08307

研究課題名(和文) 強皮症・皮膚線維化疾患における特異的・機能的 piRNA の研究

研究課題名(英文) Research of scleroderma-specific piRNA

研究代表者

神人 正寿 (Jinnin, Masatoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60401048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：COL1A1やCOL1A2など強皮症関連分子を標的のすると予測されるpiRNAのうち、強皮症真皮線維芽細胞においてCOL1A1を標的とするpiR-32364が有意に発現増加していることを見出したが、これはおそらく内在性のTGF- β シグナル活性化によるものであろうと考えられた。正常線維芽細胞でpiR-32364を強制的に過剰発現させると、COL1A1の発現はmRNAレベルでもタンパク質レベルでも有意に低下したが、COL1A2の発現は低下しなかった。したがって、強皮症線維芽細胞におけるpiR-32364の過剰発現は、コラーゲンの恒常的発現増強に対する負のフィードバックである可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の創造性として、病態の解明のみならず、診断・治療の面で臨床医学への波及効果を有する。具体例を挙げると、皮膚組織や血清で特異的piRNAを検出する事で皮膚線維化の定量評価ができれば、RNAが蛋白の上流に存在し一般に刺激に対し迅速に反応する事を考えると、より鋭敏な全く新しいマーカーの開発につながる。さらに皮膚においてpiRNAを特異的に補充あるいは阻害する事で線維化を抑制することができれば、特異的で侵襲や副作用の少ない全く新しい予防法・治療薬の開発につながる事ができる。

研究成果の概要(英文)：No difference was found in the PIWIL1-4 levels between normal and cultured scleroderma dermal fibroblasts. Among piRNAs predicted to target scleroderma-related molecules, we first found significant piR-32364 up-regulation in scleroderma dermal fibroblasts, likely due to intrinsic TGF- β signaling. Forced piR-32364 overexpression in normal fibroblasts significantly reduced COL1A1 expression both at mRNA and protein levels, but not COL1A2. Thus, piR-32364 overexpression in scleroderma fibroblasts may be the negative feedback against collagen up-regulation, which could suggest the potential of piRNAs as a therapeutic target.

研究分野：全身性強皮症、血管腫

キーワード：全身性強皮症

1. 研究開始当初の背景

新しい研究手法の開発により多くのヒト疾患の原因や病態が明らかになりつつあるが、膠原病については未だ病態が解明されていない。元来、膠原病は膠原線維(コラーゲン)における異常が存在する疾患群と定義されてきたが、その一つである全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器にコラーゲンの異常蓄積による線維化を生じる全身疾患である(図1)。しかしコラーゲン異常蓄積の機序は未だ不明であり、線維化は進行すると難治であるため早期診断が必要だが有用な血液マーカーは同定されておらず、また有効な治療法にも乏しいことが臨床上の課題である。これまで実に多くの臨床・基礎研究がなされてきたが、本疾患には heterogeneity が存在し症例ごとに多彩な病状を呈するために課題の解決には至っていない。

膠原病の発症には一般に遺伝素因と環境素因が関与すると考えられ、後者が特に heterogeneity に影響を与えていると考えられるが、研究代表者らはその環境因子として未だ十分に検討されていない分子機構である non-coding RNA に注目してきた。ヒトの細胞には蛋白質をコードしていない non-coding RNA が存在しこれまで「ゴミ」とわれてきたが、実は DNA(遺伝素因)を後天的に修飾することで環境因子として DNA-mRNA-蛋白発現をオン/オフする機構であるエピジェネティクスに関わる(図2)。小分子 RNA を主体とするものと比較的長い RNA を主体とするものに分類され、前者の代表が平均 22 塩基程度の microRNA であり、様々な mRNA の 3' UTR の相補的配列に結合し翻訳を阻害する事で蛋白発現調節をしている。

一方、non-coding RNA のうち、ここ十年の間に RNA サイレncing 機構のひとつとして知られるようになった PIWI-interacting RNA (piRNA) は約 30 塩基の小分子 RNA で、配列に相補性のある標的 RNA へ RNA スライサー活性を持つ PIWI タンパク質をガイドすることにより、その発現を抑制する(図3)。よって、piRNA もまた遺伝子-蛋白の発現調節に関連する機能を有し環境因子となりうる。さらに piRNA 経路にかかわる因子の欠損はトランスポゾンの活性化や配偶子の形成不全をひき起こすことからゲノムの完全性を維持するうえでもきわめて重要な役割を担うと考えられ、最近では腫瘍性疾患への関わりが注目されているが、一方 piRNA 経路の炎症性疾患での役割は少数の報告がみられるものの完全には特定されておらず、皮膚疾患や膠原病ではほとんど検討もされていない。我々は未だ原因が判明していない強皮症およびその類縁の皮膚線維化疾患において piRNA 経路が病態に関与し、新しい疾患マーカーおよび治療標的となりうるか? という学術的「問い」を有するに至った。

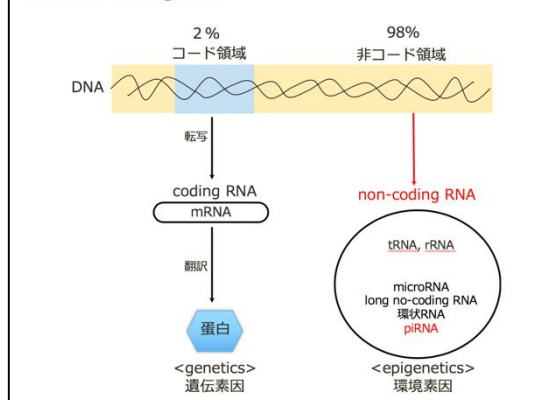
2. 研究の目的

本研究の目的は piRNA の皮膚線維化への関与を明らかにすることである。本研究計画では コラーゲンあるいはコラーゲン発現に正の作用を有する分子をターゲットとする疾患特異的 piRNA が線維化疾患皮膚の真皮線維芽細胞において発現低下をきたし、あるいは負の作用を有する分子をターゲットとする piRNA が増加することで結果的に皮膚でのコラーゲンの異常蓄積が生じるという結果を予想している。

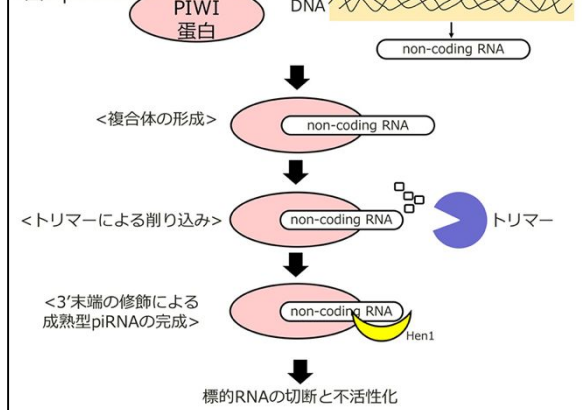
<図1 全身性強皮症患者の線維化皮膚>



<図2 non-coding RNA>



<図3 piRNA>



3. 研究の方法

まず piRNA および PIWI の発現が強皮症など線維化疾患の病変部皮膚でコントロール皮膚に比べて変化しているかを確認した。病変部皮膚組織のパラフィン標本あるいは病変部由来培養線維芽細胞から total RNA を抽出し、Quantitative real-time PCR を行った。当初選択した piRNA の発現に変化がみられなければ、次世代シーケンサーを用いたアレイ（アメリエフ社）により数万種類の piRNA 発現を調べ、線維化皮膚でコントロールと比較して発現異常を示す piRNA を同定する。

そして培養線維芽細胞を用いて、線維化皮膚で発現低下している PIWI/piRNA については siRNA あるいは CRISPR/Cas9 で抑制した場合、あるいは発現亢進している PIWI/piRNA についてはレンチウイルスで強発現した場合に生じる変化（細胞増殖能・遊走能・コラーゲン関連分子発現など）を観察し、コラーゲン発現を調節する働きのある機能的な皮膚線維化関連 PIWI/piRNA 同定をこころみた。加えてこれまでの研究代表者の研究を発展させるべく、piRNA と microRNA が相互作用する可能性や、microRNA が転写因子などを介して piRNA の発現を制御している可能性について免疫沈降法などでの検討を予定した。

4. 研究成果

正常と強皮症の培養皮膚線維芽細胞の間で、PIWIL1-4 レベルに差は見られなかった。COL1A1 や COL1A2 など強皮症関連分子を標的のすると予測される piRNA のうち、強皮症真皮線維芽細胞において COL1A1 を標的とする piR-32364 が有意に発現増加していることを見出したが、これはおそらく内在性の TGF- β シグナル活性化によるものであろうと考えられた。正常線維芽細胞で piR-32364 を強制的に過剰発現させると、COL1A1 の発現は mRNA レベルでもタンパク質レベルでも有意に低下したが、COL1A2 の発現は低下しなかった。したがって、強皮症線維芽細胞における piR-32364 の過剰発現は、コラーゲンの恒常的発現増強に対する負のフィードバックである可能性があり、治療標的としての piRNA の可能性を示唆していると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakata Mariko, Kunimoto Kayo, Kawaguchi Ami, Inaba Yutaka, Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Kakimoto Nobuyuki, Suenaga Tomohiro, Tokuhara Daisuke, Jinnin Masatoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Analysis of cytokine profiles in sera of single and multiple infantile hemangioma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 906 ~ 911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16781	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 Watanabe Akane, Shima Yoshihito, Takahashi Hiroki, Akiyama Yuji, Kodera Masanari, Jinnin Masatoshi, Azuma Naoto, Ishii Koji, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 未
2. 論文標題 Arm heating to relieve Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis: A single-arm multicentre prospective clinical trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 未
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mr/roac116	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 Tosuji Emi, Inaba Yutaka, Muraoka Kyoko, Kunimoto Kayo, Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Jinnin Masatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 The clinical significance of dupilumab-induced blood eosinophil elevation in Japanese patients with atopic dermatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 164 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01046	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 Sawamura Soichiro, Makino Katsunari, Ide Maho, Shimada Shuichi, Kajihara Ikko, Makino Takamitsu, Jinnin Masatoshi, Fukushima Satoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Elevated Alpha 1(I) to Alpha 2(I) Collagen Ratio in Dermal Fibroblasts Possibly Contributes to Fibrosis in Systemic Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6811 ~ 6811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23126811	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 Kunimoto Kayo, Yamamoto Yuki, Jinnin Masatoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 ISSVA Classification of Vascular Anomalies and Molecular Biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2358 ~ 2358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042358	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 Hashimoto Aya, Kunimoto Kayo, Kawaguchi Ami, Inaba Yutaka, Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Kakimoto Nobuyuki, Suenaga Tomohiro, Takeuchi Takashi, Suzuki Hiroyuki, Jinnin Masatoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of onset and clinical characteristics in Japanese patients with infantile hemangioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 210 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2021.01066	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 Sakata Yasuhiro, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Iwahashi Yoshifumi, Murata Shin-ichi, Asamura Shinichi, Jinnin Masatoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 The clinical significance of cytokeratin 20 staining pattern in Merkel cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 162 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2021.01043	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 Tani Sayaka, Kaminaka Chikako, Nishiyama Kosuke, Yariyama Azusa, Nakatani Yumi, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Yamamoto Yuki, Makino Katsunari, Makino Takamitsu, Jinnin Masatoshi	4. 巻 102
2. 論文標題 yRNA3 up-regulation in cultured dermal fibroblasts and yRNA4 down-regulation in the sera of scleroderma patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 68 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.01.006	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 神人正寿	4. 巻 41
2. 論文標題 脈管異常の新ISSVA分類と分子生物学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 画像診断	6. 最初と最後の頁 1186-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 稲田 有亮, 上出 康二, 山本 有紀, 神人 正寿.	4. 巻 64
2. 論文標題 左頬部に再発したEndocrine Mucin-producing Sweat Gland Carcinomaの1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 247-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小原 由季, 豊島 美咲, 仲尾次 浩一, 濱田 和彦, 神人 正寿.	4. 巻 20
2. 論文標題 高齢者女性の皮膚における生理学的特性の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 皮膚の科学	6. 最初と最後の頁 174-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 神人 正寿, 澤村 創一郎, 牧野 雄成, 尹 浩信.	4. 巻 16
2. 論文標題 皮膚画像解析ソフトを用いた全身性強皮症患者の顔面皮膚老化の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 加齢皮膚医学セミナー	6. 最初と最後の頁 33-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 神人 正寿	4. 巻 79
2. 論文標題 【皮膚悪性腫瘍(第2版)下-基礎と臨床の最新研究動向-】血管肉腫 診断(病理、遺伝子解析、画像)と予後因子	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 371-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 神人 正寿	4. 巻 79
2. 論文標題 【皮膚悪性腫瘍(第2版)下-基礎と臨床の最新研究動向-】有棘細胞癌(日光角化症・Bowen 病) 有棘細胞癌の分子生物学と発がん機序 有棘細胞癌の遺伝子異常 概論	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 28-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Iwai Miki, Nakaoji Koichi, Hamada Kazuhiko, Inaba Yutaka, Muraoka Kyoko, Tohsuji Emi, Jinnin Masatoshi	4. 巻 Volume 17
2. 論文標題 Correlations Between Serum Cytokine Levels and the Use of a Moisturizer in Elderly Women in Accordance with the Improvement of Objective and Subjective Skin Condition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology	6. 最初と最後の頁 237 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CCID.S440336	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 Tanaka Minako, Inaba Yutaka, Yariyama Azusa, Nakatani Yumi, Kunimoto Kayo, Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Makino Katsunari, Fukushima Satoshi, Jinnin Masatoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression of collagen-related piRNA is dysregulated in cultured dermal fibroblasts derived from patients with scleroderma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 241 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/irdr.2023.01056	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 Toyoshima Misaki, Nakaoji Koichi, Hamada Kazuhiko, Yamanaka Azusa, Inaba Yutaka, Muraoka Kyoko, Tohsuji Emi, Sakakibara Kanako, Saji Nagisa, Jinnin Masatoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Analysis of skin aging patterns using a facial imaging system in patients with atopic dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 383 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2023.4528	査読の有無 無
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 Kurimoto Nishiguchi Mana, Muraoka Kyoko, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Yamamoto Yuki, Kumegawa Shinji, Ueno Kazuki, Asamura Shinichi, Nakatani Yumi, Sawamura Soichiro, Makino Katsunari, Jinnin Masatoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Glycoprotein M6A upregulation detected by transcriptome analysis controls the proliferation of keloidal fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1170 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16861	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神人正寿
2. 発表標題 血管腫・血管奇形の遺伝子異常・分子病態学
3. 学会等名 第2回シロリムス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神人正寿
2. 発表標題 教育講演 血管腫・血管奇形の分子病態学
3. 学会等名 第17回日本血管腫血管奇形学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神人正寿
2. 発表標題 教育講演 血管奇形の基礎と最近の考え方
3. 学会等名 第39回日本美容皮膚科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神人正寿
2. 発表標題 教育講演 血管腫の最新治療とそのタイミング
3. 学会等名 第45回日本小児皮膚科学会（招待講演）
4. 発表年 2021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