

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年8月29日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592003

研究課題名（和文）ケロイドにおける COL1A2 プロモーターの転写に関わる microRNA の発現調節

研究課題名（英文）The mechanisms of transcriptional regulation by microRNAs in relation to COL1A2 promoter region in keloid

研究代表者

清水 一（SHIMIZU HAJIME）

日本医科大学・老人病研究所・マネジメントサポートスタッフ

研究者番号：60398873

研究成果の概要（和文）：本研究はケロイド病変でコラーゲン産生に関わる COL1A2 プロモーター領域の microRNA 遺伝子の検索にある。ケロイド(KF)及び正常線維芽細胞の mRNA を用い miRNA 遺伝子の網羅的解析で KF において発現上昇 miRNA 遺伝子に miR-503, 886-3p, 129-3p, 199b-5p, 145, 19a, 221, 218, 7, 21, 1274a が, miR-1915, 10a に発現低下が確認された。KF で有意に低下した miR-10a の機能解析を行なった。miR-10a に対する inhibitor と activator=retinoic acid (RA)を用い q-PCR 法と上清中のコラーゲン産生能の解析を行なった。miR-10a は inhibitor で減少し, RA により増加した。さらに, miR-10a を KF に導入したところコラーゲン産生が低下し miR-10a がコラーゲン産生の調節への関与が示された。この結果からケロイド線維化の抑制の標的として miRNA-10a の存在と治療応用への可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We aimed to investigate expression profiles of microRNAs (miRNAs) in order to understanding the molecular mechanism(s) involved in the pathogenesis of keloid. We confirmed that miR-10a was significantly under-expressed in keloid fibroblasts (KFs) compared with normal dermal fibroblasts (NFs).

Inhibition and induction of miR-10a respectively by miRNA inhibitor and retinoic acid (RA) in KFs and NFs revealed that IL-6 and pro-collagen type I (PICP) secretions in the culture supernatants were decreased by miR-10a inhibitor and increased by RA treatment. These results suggest that miR-10a regulates the synthesis and secretion of collagen in KFs and NFs. KF and NF cells were transfected with miR-10a oligonucleotide. The secretion of PICP was reduced in miR-10a transfected KFs and NFs. The miR-10a was significantly over-expressed in KFs and NFs after treatment with RA. The treated cells were harvested for miR-10a qPCR assay and the culture supernatant was analyzed for IL-6 and PICP secretion by ELISA method. The assays indicated that IL-6 concentrations were markedly increased in KFs compared with NFs after RA treatment.

Our data confirmed the differential expression of miR-10a in KFs compared with NFs. The miR-10a regulates the synthesis and secretion of collagen in KFs and NFs. Down-regulation of miR-10a may be one of the mechanisms by which collagen is highly deposited in KFs. Our results showed that miR-10a is a promising new effective strategy for targeting keloid lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ケロイド・microRNA・線維化

### 1. 研究開始当初の背景

ケロイドの発生病序は、国内外において未だ解明されない形成外科領域の難治性疾患の代表となっておりその治療方法も確立されていない重要な研究課題である。我々は、ケロイド原因遺伝子の解明及び新治療の確立を目指して分子レベルの解析を行ってきた。ケロイド病変ではIL-6が活性化しており、このIL-6シグナルはTGF-betaやPDGFにより誘導されケロイドで過剰発現する事を報告してきた。

### 2. 研究の目的

本研究は、TGF-betaとPDGFシグナル伝達に関与するmicroRNA遺伝子を解析しケロイド線維化調節に関わるCOLIA2プロモーターの転写に関わるmicroRNA遺伝子の発現調節を明らかにすることにある。

### 3. 研究の方法

(1) 正常線維芽細胞及びケロイド線維芽細胞から抽出したRNAサンプルを個々にラベルしてprobeを作成し、microRNA Human chipにて発現解析を行ないmiRNA遺伝子の網羅的解析を行った。発現上昇を示した遺伝子であるmiR-503、miR-19a遺伝子、発現低下を示したmiR-10a、miR-1915についてq-PCR法にてNF及びKFでのmRNAの発現を確認した。

(2) 有意の発現低下を認めた miR-10a遺伝子を標的にNF、KFでの機能確認のための実験を標的microRNA遺伝子に対するinhibitorとactivatorを用い、過剰発現あるいは抑制させることで遺伝子の機能確認を行った。

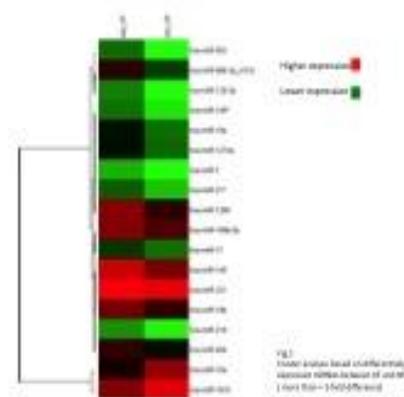
(3) さらにNF及びKFにおいて、miR-10a遺伝子がコラーゲン及びIL-6の産生量への影響について検討した。

(3) はmiR-10a遺伝子をNF、KFに遺伝子導入しコラーゲン産生能を確認する事でケロイドにおける線維化機構の抑制の標的としてのmicroRNA遺伝子の可能性を検討した。

### 4. 研究成果

正常線維芽細胞(NF)及びケロイド線維芽細胞(KF)から抽出したRNAサンプルを用microRNA遺伝子の網羅的解析を行ったところ、KFにおいてNFに比べ2倍以上の発現上昇を認めたmicro-RNA遺伝子にmiR-503、miR-886-3p、

miR-129-3p、miR-199b-5p、miR-145、miR-19a、miR221、miR218、miR-7、miR-21、miR-1274aなどの遺伝子群が検出された。発現低下を示した遺伝子にはmiR-1915、miR-10aなどが発現解析により確認された(図1、表1)。



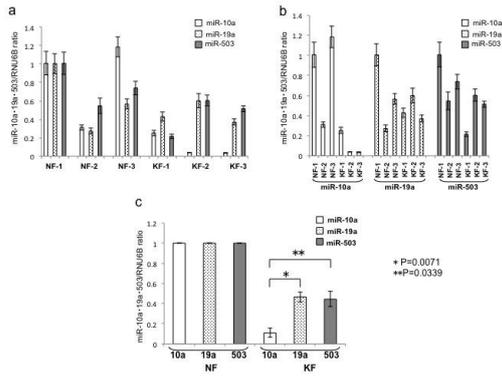
miRNA	Fold change(KF/NF)	Regulation(KF/NF)
has-miR-503	4.740	up
has-miR-886-30	3.071	up
has-miR-129-3p	2.798	up
has-miR-199b-5p	2.729	up
has-miR-145	2.699	up
has-miR-19a	2.517	up
has-miR-145	2.511	up
has-miR-221	2.450	up
has-miR-218	2.427	up
has-miR-7	2.400	up
has-miR-21	2.349	up
has-miR-1274a	2.313	up
has-miR-1260	2.297	up
has-miR-17	2.263	up
has-miR-494	2.192	up
has-miR-19b	2.038	up
has-miR-10a	5.568	down
has-miR-1915	2.103	down

Table 1 Differentially expressed in KFs compared with NFs (more than > 2-fold difference)

(図、表 1)

発現上昇を示した遺伝子であるmiR-503、miR-19a遺伝子、発現低下を示したmiR-10a、miR-1915についてq-PCR法にてNF及びKFでのmRNAの発現を確認したところmiR-10、miR-1915の有意の発現低下を認めた(図2)。

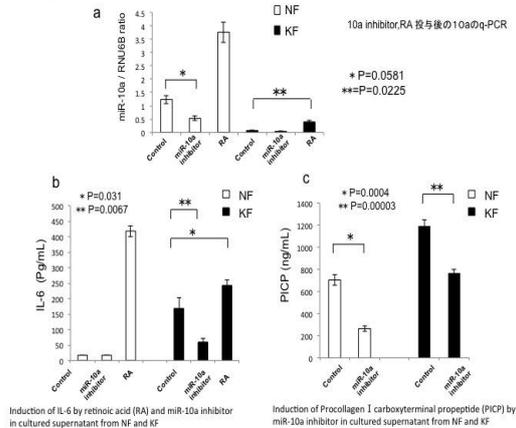
Fig.2 TaqMan RT-PCR for miR-10a, -19a and -503 expression in cultured KFs and NFs



(図2)

これらのmicroRNA遺伝子のNF, KFでの機能確認のための実験を標的microRNA遺伝子に対するinhibitorとactivatorとしてのretinoic acid (RA)を用い、過剰発現あるいは抑制させることで遺伝子の機能確認を行った。さらにNF及びKFにおいて、これらの遺伝子がコラーゲン及びIL-6の産生量への影響の確認を行ったところ、inhibitorにより減少し、RAにより増加する事が確認され標的遺伝子の機能発現が確認された。結果は第25回日本皮膚外科学会総会にて発表された(図3)。

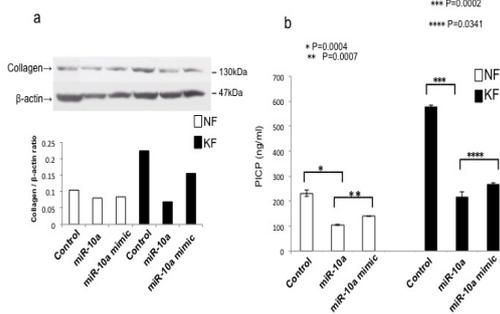
Fig.3 Suppression and activation of miR-10a by miRNA inhibitor and RA in KFs and NFs



(図3)

加えてmiR-10a oligonucleotideをケロイドに導入し、72時間後にcell lysate及び培養上清中のコラーゲン、プロコラーゲン産生量を測定してみた所、いずれも低下を示したことからmiR-10aがケロイドにおいてコラーゲン産生を調節している可能性が示唆された(図5)。

Fig.5 Secretion of collagen and PICP by miR-10a molecule transfection in KFs and NFs



(図5)

以上の結果からケロイドにおける線維化機の抑制への標的としてmicroRNA-10aの存在が明らかとなりantisense microRNA 10aを用いたantagomirによるケロイド治療への応用への可能性が今後期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) Ghazizadeh R, Shimizu H, Tosa M, Ghazizadeh M. Pathogenic Mechanisms shared between Psoriasis and cardiovascular disease. Int J Med Sci, 2010, 19:7(5), 284-289.

2) Hajime Shimizu, Takashi Sugino, Hideki Chiba. Interphase cytogenetic analysis of non-mucinous and mucinous adenocarcinoma with bronchioloalveolar pattern.

Fukushima. J Med. Sci. 58, 1, 66-74, 2012.

3) Shinichi Igota, Mamiko Tosa, Masahiro Murakami, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Hiko Hyakusoku, Mohammad Ghazizadeh. Identification and characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. Int J Med Sci 2013, 10(4), 344-354.

[学会発表] (計13件)

1) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu,

Seiko Egawa, Mamiko Tosa Inhibition of keloid fibroblast cell growth by a Src family-specific tyrosine kinase inhibitor. 第25回日本皮膚外科学会総会. 2010, 9.

2) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Hideki Chiba. Inhibition of non-small cell lung cancer cells by a Src family-specific tyrosine kinase inhibitor. 第69回日本癌学会総会. 2010, 9.

3) 清水一, モハマッドガジザデ, 枝川聖子, 千葉 英樹. チロシンキナーゼインヒビター PD173955 による非小細胞肺癌細胞株の増殖抑制効果の検討. 第51回日本肺癌学会総会. 2010, 11.

4) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Seiko Egawa, Mamiko Tosa, Involvement of Wnt signaling pathway in abnormal wound healing. 第3回日本創傷外科学会総会. 2011, 7.

5) 伊吾田慎一, ガジザデモハマッド, 土佐眞美子, 清水一, 枝川聖子, 岩切致, 村上正洋, 小川令, 百束比古. 顔面の組織欠損に対する再建方法の検討. 第3回日本創傷外科学会総会. 2011, 7.

6) 清水一, 土佐眞美子, 伊吾田慎一, 枝川聖子, ガジザデモハマッド. ケロイド発症の病因に関与するmicroRNA遺伝子について. 第26回日本皮膚外科学会総会. 2011, 8.

7) Mohammad Ghazizadeh, Shinichi Igota, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Targeting the Wnt signaling Pathway

in keloid. 第26回日本皮膚外科学会総会. 2011, 8.

8) Tomoyo Ueno, Shinichi Igota, Mamiko Tosa, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Mohammad Ghazizadeh. Characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. 第79回日本医科大学医学会総会. 2011, 9.

9) 伊吾田慎一, 土佐眞美子, 枝川聖子, 清水一, 村上正洋, 百束比古, ガジザデモハマッド. Involvement of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. 第20回日本形成外科学会基礎学術集会. 2011, 10.

10) Mohammad Ghazizadeh, Hajime Shimizu, Seiko Egawa, Mamiko Tosa. Potential involvement of the stem cell factor receptor c-kit in keloid pathogenesis. 第110回日本皮膚科学会総会. 2012, 6.

11) Mohammad Ghazizadeh, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko Tosa. Characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis. 65<sup>th</sup> International Conference on Tissue Science and Engineering. 2012, 10.

12) Mohammad Ghazizadeh, Seiko Egawa, Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko Tosa. Involvement of a Wnt/ $\beta$ -catenin canonical signaling pathway in keloid pathogenesis. 第37回日本研究皮膚科学会総会. 2012, 12.

13) Hajime Shimizu, Shinichi Igota, Mamiko

Tosa, Seiko Egawa, Mohammad Ghazizadeh.

MicroRNA expression profiles in keloid and normal dermal fibroblasts.

第37回日本研究皮膚科学会総会. 2012, 12.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 一 (SHIMIZU HAJIME)

日本医科大学・老人病研究所・マネージメントサポートスタッフ

研究者番号：60398873

(2) 研究分担者

モハマッド ガジザデ (M GHAZIZADEH)

日本医科大学・老人病研究所・准教授

研究者番号：30190979

(3) 土佐 眞美子 (TOSA MAMIKO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30301568

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：