

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791279

研究課題名（和文）

各種皮膚疾患における血清マイクロRNAの検討

研究課題名（英文）

serum microRNA levels in skin diseases

研究代表者

神人 正寿（ JINNIN MASATOSHI ）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：60401048

研究成果の概要（和文）：本研究により、miRNeasy RNA isolation kit を用いて血清中の microRNA を定量できる事を確認した。さらに血清中での発現が確認された microRNA について全身性強皮症・乾癬・悪性黒色腫・有棘細胞癌や限局性強皮症・皮膚筋炎などの患者群で血清 microRNA 濃度を測定し、正常対照群や他疾患との比較を行い、これらの疾患において有用な疾患マーカーとなる可能性を報告できた。また、強皮症のモデルマウスにおいて let-7a の腹腔内注射により線維化を抑制できる可能性も見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we found that microRNA can be purified from serum by miRNeasy RNA isolation kit. We compared serum levels of various microRNAs between healthy controls or disease controls and patients with scleroderma, psoriasis, melanoma, squamous cell carcinoma, localized scleroderma or dermatomyositis. We also analyzed the correlation of serum microRNA levels and clinical/laboratory features in each disease. We suggest a possibility that serum microRNA levels can be useful markers for diagnosis or evaluating disease activities. Furthermore, we revealed that the intermittent overexpression of let-7a in the mice skin by intraperitoneal injection attenuated the skin fibrosis induced by bleomycin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚，microRNA，強皮症

## 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症や尋常性乾癬など、分子生物学的機序が解明されつつあるにもかかわらず臨床的に有用な疾患マーカーがいまだ見つからない皮膚疾患は数多く存在する。血液および血清は患者サンプルの中でも最も取得しやすい検体の一つである事を考えると、これらを用いた診断および病勢マーカーは今後医学が進歩してもその重要性が損な

われる事は無いと予想される。本研究で我々は血清 microRNA が様々な皮膚疾患の診断あるいは病勢マーカーになりうる可能性に注目した。これまで皮膚疾患において血清 microRNA はほとんど検討されていない。microRNA は蛋白よりも上流に位置するため、血清 microRNA 濃度はより鋭敏な疾患マーカーになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

未だ臨床的に有用な血清マーカーが見いだされていない様々な皮膚疾患における血清 microRNA 濃度を測定し、正常対照群との比較や臨床症状との相関の検討を通して、血清 microRNA が各疾患において診断・病勢マーカーとなりうるかどうかを調べる。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度は、患者血清から total microRNA を効率的に抽出する方法を検討し、その後各疾患患者由来の血清から miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて total microRNA を抽出精製し、各疾患の病態と関連するとおぼしき microRNA の血清濃度を正常群や他疾患群と比較検討し、臨床症状との相関を調べた。平成 24 年度は前年の結果をもとに、さらに幅広い疾患における血清 microRNA についても検討した。また、microRNA の治療応用の可能性を検討するため、各 microRNA をモデルマウスに投与し生じる変化を観察した。

## 4. 研究成果

H23 年度は研究計画にそって、miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いた方法により血清中の microRNA を抽出・定量できる事を確認した (Kawashita Y, J Dermatol Sci. 2011)。さらに血清中での発現が確認された microRNA について様々な皮膚疾患の患者群で血清 microRNA 濃度を測定し、正常対照群や他疾患との比較を行った。さらに患者群において臨床症状との相関を行う事により以下のことを報告することが出来た。

(1) 全身性強皮症患者における血清 miR-29a 濃度は正常人と比べて変化なかったものの、前駆病態である強皮症関連病態においては miR-29a 濃度の有意な減少を認め、病初期の病態形成に関与している可能性が示唆された。また、強皮症における血清 miR-29a 減少例では推定肺動脈圧の増加傾向が見られた (Kawashita Y, J Dermatol Sci. 2011)。一方、強皮症患者における血清 miR-196a 濃度は正常人と比べて変化していないものの、miR-196a 減少例では皮膚硬化の重症例が多かった (Honda N, et al. J Immunol. 2012)。同様に強皮症患者においては正常人や他の膠原病患者に比べて miR-142-3p 濃度が増加していた。また、miR-142-3p 増加症例では舌小体短縮を有する頻度が増加していた (Makino K, et al. Clin Exp Dermatol. 2012)。

(2) 尋常性乾癬患者では血清 miR-1266 濃度が増加し、皮疹の重症度と逆相関する傾向が見られた (Ichihara A, et al. Eur J Dermatol. 2012)。一方、乾癬患者では有意ではないものの血清 miR-424 濃度が減少していた (Ichihara A, et al. Br J Dermatol. 2011)。同様に、乾癬患者では血清において miR-19a と miR-29a が有意ではないものの減少傾向にあり、皮疹の重症度と逆相関する傾向が見られた (Oyama R, J Dermatol Sci. 2011)。

(3) 悪性黒色腫患者では血清 miR-221 濃度が有意に増加しており、腫瘍の進展度とも相関していた。 (Kanemaru H, J Dermatol Sci. 2011)

H24年度はさらに全身性強皮症患者での研究を進め、またマウスモデルでの実験を追加した。加えて有棘細胞癌と限局性強皮症・皮膚筋炎患者でも血清microRNA濃度を測定した。

(1) 強皮症において integrin をターゲットとする miR-150 の血清濃度は正常人と比べて有意に減少しており、診断マーカーとして有用であると考えられた。また、指尖虫喰状癬痕や指尖潰瘍・抗トポイソメラーゼ I 抗体との相関を認め、病勢のマーカーとしても有用である事を見いだした (Honda N, Am J Pathol 2012)。同様に miR-92a は MMP-1 をターゲットとし、血清濃度が強皮症で増加している (Sing T, Rheumatology 2012)。miR-92a 増加例では毛細血管拡張の頻度が有意に低く、血管病変との関連が疑われた。

また、強皮症のモデルマウスとしてブレオマイシンを局注して皮膚の線維化を誘導したマウスの腹腔内に let-7a を注射したところ、線維化を抑制することができた (Makino K, J Immunol. 2013)。

(2) 皮膚筋炎患者では血清 miR-21 濃度が正常人に比べて有意に増加し、患者の血清 IgG 濃度と相関を示した (Shimada S, et al. Clin Exp Rheumatol 2012)。一方、miR-7 は正常人あるいは他の膠原病患者に比べて皮膚筋炎患者血清で減少していた (Oshikawa Y, Acta Derm Venereol. 2012)。

(3) 限局性強皮症患者では血清 miR-7 濃度が減少し診断に有用であると考えられた (Etoh M, Arch Dermatol Res. 2013)。

(4) 有棘細胞癌患者の血清中miR-124濃度は皮膚でのmiR-124量発現を反映し、腫瘍の進展と逆相関を示した (Yamane K, J Mol Med. 2013)。

#### 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 38 件)

1, Makino K, Jinnin M, Hirano A, et al. The Downregulation of microRNA let-7a Contributes to the Excessive Expression of Type I Collagen in Systemic and Localized Scleroderma, J Immunol., 査読あり, 2013 in press

2, Aoi J, Makino K, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Jinnin M, et al. Case of paraneoplastic pemphigus with follicular lymphoma treated with rituximab, J Dermatol., 査読あり, 2013 in press

3, Oshikawa Y, Jinnin M, Makino T, et al. Decreased miR-7 Expression in the Skin and Sera of Patients with Dermatomyositis, Acta Derm Venereol., 査読あり, 2013 in press

4, Kajihara I, Jinnin M, Honda N, et al. Scleroderma dermal fibroblasts overexpress vascular endothelial growth factor due to autocrine transforming growth factor  $\beta$  signaling, Mod Rheumatol., 査読あり, 2013 in press.

5, Kanemura H, Fukushima S, Yamashita J, Jinnin M, et al. Serum epidermal growth factor receptor levels in patients with malignant melanoma, Clin Exp Dermatol., 査読あり, 38巻, 2013, 172-177

6, Etoh M, Jinnin M, Makino K, et al. microRNA-7 down-regulation mediates excessive collagen expression in localized scleroderma, Arch Dermatol Res., 査読あり, 305巻, 2013, 9-15

7, Yamashita J, Iwakiri T, Fukushima S, Jinnin M, et al. The rs2910164 G>C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant

melanoma, Melanoma Res., 査読あり, 23巻, 2013, 13-20

8, Honda N, Jinnin M, Kira-Etoh T, et al. miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin  $\beta$ 3, Am J Pathol., 査読あり, 182巻, 2013, 206-216

9, Shimada S, Jinnin M, Ogata A, et al. Serum miR-21 levels in patients with dermatomyositis, Clin Exp Rheumatol., 査読あり, 31巻, 2013, 161-162

10, Kudo H, Jinnin M, Yamane K, et al. Intravenous immunoglobulin treatment recovers the down-regulated levels of Th1 cytokines in the sera and skin of scleroderma patients, J Dermatol Sci., 査読あり, 69巻, 2013, 77-80

11, Maekawa T, Jinnin M, Ohtsuki M, et al. Serum levels of interleukin-1 $\alpha$  in patients with systemic sclerosis, J Dermatol., 査読あり, 40巻, 2013, 98-101

12, Sakoguchi A, Jinnin M, Makino T, et al. The miR-146a rs2910164 C/G polymorphism is associated with telangiectasia in systemic sclerosis, Clin Exp Dermatol., 査読あり, 38巻, 2013, 99-100

13, Makino K, Jinnin M, Aoi J, et al. Discoidin domain receptor 2-microRNA 196a-mediated negative feedback against excess type I collagen expression is impaired in scleroderma dermal fibroblasts, J Invest Dermatol., 査読あり, 133巻, 2013, 110-119

14, Yamane K, Jinnin M, Etoh T, et al. Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK, J Mol Med., 査読あり, 91巻, 2013, 69-81

15, Takashio S, Izumiya Y, Jinnin M, et al. Diagnostic and prognostic value of subcutaneous tissue biopsy in patients

- with cardiac amyloidosis, *Am J Cardiol.*, 査読あり, 110巻, 2012, 1507-1511
- 16, Yamashita J, Fukushima S, Jinnin M, et al. Kinesin family member 20A is a novel melanoma-associated antigen, *Acta Derm Venereol.*, 査読あり, 92巻, 2012, 593-597
- 17, Aoi J, Ogata A, Makino T, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Jinnin M, et al. Case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, *J Dermatol.*, 査読あり, 39巻, 2012, 1066-1067
- 18, Kuwahara A, Jinnin M, Makino T, et al. Angiogenin expression in the sera and skin of patients with rheumatic diseases, *Biosci Trends.*, 査読あり, 6巻, 2012, 229-2334,
- 19, Oshikawa Y, Fukushima S, Miyake T, Kawaguchi T, Motomura K, Nakashima Y, Nakamura K, Jinnin M, et al. Photosensitivity and acute liver insufficiency in late-onset erythropoietic protoporphyria with a chromosome 18q abnormality, *Case Rep Dermatol.*, 査読あり, 4巻, 2012, 144-149
- 20, Kajihara I, Jinnin M, Makino T, et al. Overexpression of hepatocyte growth factor receptor in scleroderma dermal fibroblasts is caused by autocrine transforming growth factor  $\beta$  signaling, *Biosci Trends.*, 査読あり, 6巻, 2012, 136-142
- 21, Sing T, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma, *Rheumatology*, 査読あり, 51巻, 2012, 1550-1556
- 22, Hayashi Y, Jinnin M, Makino T, et al. Serum angiopoietin-like protein 3 concentrations in rheumatic diseases, *Eur J Dermatol.*, 査読あり, 22巻, 2012, 500-504
- 23, Nakayama W, Jinnin M, Makino K, et al. CD163 expression is increased in the involved skin and sera of patients with systemic lupus erythematosus, *Eur J Dermatol.*, 査読あり, 22巻, 2012, 512-517
- 24, Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts, *J Immunol.*, 査読あり, 188巻, 2012, 3573-3583
- 25, Honda N, Jinnin M, Kajihara I, et al. TGF- $\beta$ -mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts, *J Immunol.*, 査読あり, 188巻, 2012, 3323-3331
- 26, Ogata A, Endo M, Aoi J, Takahashi O, Kadomatsu T, Miyata K, Tian Z, Jinnin M, et al. The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis, *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読あり, 418巻, 2012, 494-499
- 27, Kajihara I, Jinnin M, Makino T, et al. Clinical significance of cobblestone appearance on the skin of patients with systemic sclerosis, *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 査読あり, 26巻, 2012, 123-125
- 28, Kajihara I, Jinnin M, Yamane K, et al. Increased accumulation of extracellular thrombospondin-2 due to low degradation activity stimulates type I collagen expression in scleroderma fibroblasts, *Am J Pathol.* 査読あり, 180巻, 2012, 703-714
- 29, Ichihara A, Jinnin M, Oyama R, et al. Increased serum levels of miR-1266 in patients with psoriasis vulgaris, *Eur J Dermatol.*, 査読あり, 22巻, 2012, 68-71
- 30, Kudo H, Fukushima S, Masuguchi S, Sakai K, Jinnin M, et al. Cutaneous type adult T-cell leukaemia/lymphoma successfully treated with narrowband ultraviolet B phototherapy, *Clin Exp Dermatol.*, 査読あり, 37巻, 2012, 183-184
- 31, Makino K, Jinnin M, Kajihara I, et al. Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis, *Clin Exp Dermatol.*, 査読あり, 37巻, 2012, 34-39

32, Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis, *Cancer Res.*, 査読あり, 71巻, 2011, 7502-7512

33, Masuguchi S, Jinnin M, Fukushima S, et al. The expression of HER-2 in extramammary Paget's disease, *Biosci Trends.*, 査読あり, 5巻, 2011, 151-155

34, Jinnin M, Fukushima S, Masuguchi S, et al. Evaluation of usefulness of 3D views for clinical photography, *Biosci Trends.*, 査読あり, 5巻, 2011, 211-216

35, Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris, *Br J Dermatol.*, 査読あり, 165巻, 2011, 1003-1010

36, Maekawa T, Jinnin M, Ohtsuki M, et al. The expression levels of thrombospondin-1 in dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans, *Eur J Dermatol.*, 査読あり, 21巻, 2011, 534-538

37, Arakawa H, Jinnin M, Muchemwa FC, et al. Adiponectin expression is decreased in the involved skin and sera of diffuse cutaneous scleroderma patients, *Exp Dermatol.*, 査読あり, 20巻, 2011, 764-766

38, Xie Y, Jinnin M, Zhang X, et al. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in discoid lupus erythematosus, *Biosci Trends.*, 査読あり, 5巻, 2011, 83-88

[学会発表] (計 8 件)

1, 神人正寿, microRNA と皮膚疾患, スカイクラブ研究会, 2013年2月23日, 静岡 (淡島ホテル)

2, 井上久仁子, 神人正寿ら, The down-regulation of miR-223 contributes to the formation of Gottorn's eruption via the induction of PKCε in dermatomyositis,

37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012年12月8日, 沖縄 (LOISIR HOTEL NAHA)

3, 本多教稔, 神人正寿ら, microRNA-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin β3, 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012年12月8日, 沖縄 (LOISIR HOTEL NAHA)

4, 神人正寿, コラーゲンの発現制御, スカイクラブ研究会, 2012年6月9日, 三重 (戸田屋)

5, 本多教稔, 神人正寿ら, 全身性強皮症の皮膚線維化における microRNA196a の関与の検討, 強皮症研究会議, 2012年1月14日, 東京 (エーザイ)

6, 市原麻子, 神人正寿ら, microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris, 日本研究皮膚科学会, 2011年12月9日, 京都 (国際会館)

7, 本多教稔, 神人正寿ら, TGF-β-Mediated Downregulation of MicroRNA-196a Contributes to the Constitutive Upregulated Type I Collagen Expression in Scleroderma Dermal Fibroblasts, 日本研究皮膚科学会, 2011年12月9日, 京都 (国際会館)

8, 神人正寿, 繊維化における microRNA の関与, 結合組織学会, 2011年6月11日, 大分 (ビーコンプラザ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神人 正寿 (JINNIN MASATOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号: 60401048