

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 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23792040

研究課題名（和文） 遺伝的多型に基づくケロイド疾患感受性遺伝子の同定及び蛋白機能解析

研究課題名（英文） A genome-wide association study for keloid disease and functional analysis of keloid candidate genes

研究代表者

中島 光子 (NAKASHIMA MITSUKO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20541965

研究成果の概要（和文）：

ゲノムワイド関連解析にてケロイドと有意な関連を示す 3 領域 4 座位を同定した。その中の 1 領域において新規の non-coding RNA 遺伝子の同定に成功し、本遺伝子の発現がケロイド組織において高発現を示し、繊維芽細胞の増殖を促進する働きを有することが明らかとなった。またマイクロアレイ解析の結果から本遺伝子が wnt シグナル経路の調節を介してケロイド形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We carried out multi-stage genome-wide association study and identified four susceptible loci to keloid. Among the four loci, we identified the new long non-coding RNA genes in one locus. These genes showed higher expression in keloid tissues than normal skin tissues and contributed to accelerate the fibroblast cell proliferation. Microarray analysis revealed these genes involved in keloid formation through Wnt signaling pathway.

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：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：GWAS、non-coding RNA、マイクロアレイ、Wnt signaling

1. 研究開始当初の背景

(1) ケロイドは外傷を起因として、その創傷治癒段階で皮膚が過剰増殖を起こす状態であり、長期にわたる経過と特異な外観ゆえに、患者に肉体的精神的苦痛を与える疾患である。さらに非常に治療抵抗性であり、ステロイド局注、シリコンジェルによる圧迫療法等の保存的治療や外科的切除および電子線照射などの治療が試みられているが、いずれも確たる効果は得られておらず、高い再発率を有する。

(2) ケロイドの発生頻度は有色人種に多く、特定の体質を有する個人に発生するなどかねてより遺伝素因の影響が強く疑われてきたケロイドは「ケロイド体質」と称される体質を有する特定の個人に発症することが知られており、また有色人種に多いこと、そしてまれではあるが家系例の報告もあることなどから、かねてより体質的なものと考えられており、遺伝素因の影響が強く疑われてきた。

(3) これまでのケロイド研究により、外傷後に誘導される多くのサイトカインや増殖因子がケロイド組織において過剰に発現しており、その形成に関与することが示唆されてきた。その中でも特に TGF- β ファミリーとそのシグナル伝達経路の関与が強く疑われており、TGF- β の過剰発現が線維芽細胞の過剰増殖およびコラーゲンの過剰産生を誘導することが知られている。しかし、現在にいたるまでケロイド発症に関する分子遺伝学的機構はいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではケロイド患者群とケロイドを発症しない対照群を対象とし、全ゲノム上の遺伝的多型情報に基づくゲノムワイド関連解析を行い、ケロイド疾患感受性遺伝子座・疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。

(2) ゲノムワイド関連解析の結果から同定された領域内に存在する、これまでに報告のない新規遺伝子の同定をおこなう。

(3) ゲノムワイド関連解析により同定された疾患感受性遺伝子について、その発現・機能解析研究を行うことで、皮膚過剰増殖の機序を明らかにすることで本疾患の予防・治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ケロイド疾患関連多型の同定

日本人ケロイド罹患者 (case) 824 例およびケロイド非罹患者 (control) 3210 例の血液検体からゲノム DNA を抽出し、イルミナ社の HumanHap 550BeadChip を用いてゲノムワイド関連解析を行ってケロイド関連疾患候補領域の同定を行う。1 次スクリーニングとして case 188 例、control 936 例を用いて 568,366 個の tag SNPs の解析を行い、有意差上位 10,000 SNPs について 2 次スクリーニングとして case 329 例、control 1456 例を追加して相関解析を行った。更に 1 次及び 2 次スクリーニングを組み合わせた結果ケロイドと強い相関を示した領域に対し、追加サンプルとして case 307 例、control 820 例を用いて replication study を行った。

(2) 新規候補遺伝子の単離同定

疾患感受性候補領域の中でデータベース上遺伝子登録のない領域に関しては、未知の遺伝子が存在する可能性があることから、EST などの転写産物情報をもとに Northern blotting 法による各種人体組織における遺伝子発現情報の解析および RACE 法、cDNA ライブラリー作成などによる新規遺伝子の単離同定を行う。

(3) 定量的遺伝子発現解析

ヒト正常皮膚および臨床ケロイド検体から mRNA の抽出・cDNA の作成を行い、Real time PCR 法による両組織における遺伝子発現の差を比較検討する。

(4) 細胞増殖能に与える影響の検討

同定された遺伝子が細胞毒性に与える影響を評価するために、同定された遺伝子の発現を si-RNA で抑制した場合について、MTT Assay を用いて細胞増殖能への影響を評価する。

(5) マイクロアレイ解析

5 種の細胞株について、同定された候補遺伝子特異的に発現を抑制する siRNA オリゴを投与した群と、対照群との遺伝子発現の違いを Affimetry 社の Affymetrix human genome U133 Plus 2.0 GeneChip array を用いて解析を行い、両群において発現情報の変化をしめす遺伝子を検索することで、候補遺伝子と関連を有する遺伝子の検索を行う。

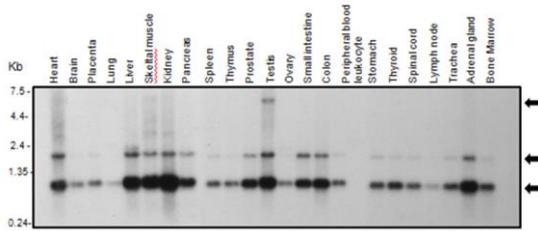
4. 研究成果

(1) ケロイド疾患関連多型の同定

ゲノムワイド関連解析の結果、Chromosome1q41 (rs873549; $P = 5.89 \times 10^{-23}$, OR = 1.77)、Chromosome3q22.3-23 (rs1511412; $P = 2.31 \times 10^{-13}$, OR = 1.87, rs940187; $P = 1.80 \times 10^{-13}$, OR = 1.98)、Chromosome15q21.3 (rs8032158; $P = 5.96 \times 10^{-13}$, OR = 1.51) の 3 領域 4 座位においてケロイドとの有意な関連が示された。3 領域のうち最も強い相関を示した 1 番染色体上の領域には既知遺伝子の報告はなかった。一方、3 番染色体領域には 4 遺伝子 (*FOXL2*, *C3orf72*, *PRR23A*, *BPESCI*) の存在が、15 番染色体領域には 1 遺伝子 (*NEDDA*) の存在が報告されている。

(2) 新規候補遺伝子の単離同定

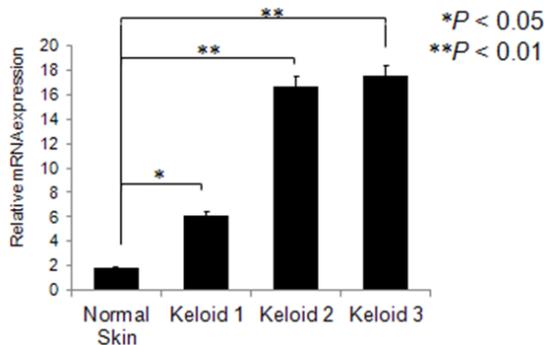
3 領域のうち最も強い相関を示した 1 番染色体上の領域には既知遺伝子の報告はなかったものの、EST(expressed sequence tag)の存在が確認されていることから、未知の遺伝子が存在している可能性が考えられた。そこで、EST 配列情報を基にノザンプロット解析を行った結果、ヒトの多数の組織において数種の異なる長さの mRNA の発現が認められた。



さらに RACE 法により同遺伝子の mRNA 全長配列の特定を試みたところ、一部共通配列を有するが、5'あるいは3'末端配列が異なる数種のバリエーションが存在する遺伝子の存在を確認した。同遺伝子内に明らかな ORF 構造が認められなかったことから、同遺伝子群は long non-coding RNA (lnc RNA) であると考えられた。

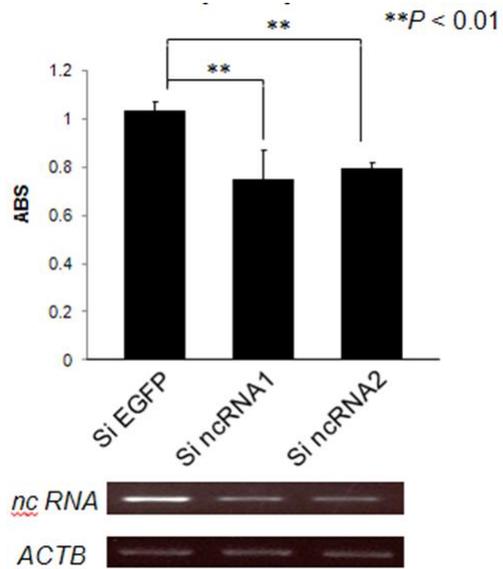
(3) 定量的遺伝子発現解析

正常皮膚組織およびケロイド組織から抽出・作成した cDNA を用いて、候補遺伝子について定量的 RT-PCR を施行し両者の遺伝子発現量の比較を行った。その結果、正常皮膚組織比較して、ケロイド組織において同遺伝子の有意な高発現を認めた。このことから、同遺伝子の高発現がケロイド形成促進に働いている可能性が示唆された。



(4) 細胞増殖能に与える影響の検討

線維芽細胞株を用いてターゲット遺伝子特異的な siRNA オリゴヌクレオチドを作成し lnc RNA の発現抑制を行い、lnc RNA 発現抑制群と対照群との細胞増殖能の変化を検討した。その結果、lnc RNA 発現抑制群において有意な細胞増殖抑制効果が認められた。



(5) マイクロアレイ解析

5 種類の細胞株を用いて lnc RNA の発現抑制時の遺伝子発現パターンの変化をマイクロアレイ解析にて検討したところ、lnc RNA の発現を抑制した群において、wnt シグナル経路を抑制する遺伝子の発現が上昇し、また AKT シグナル経路を促進する遺伝子の発現が抑制されることを発見した。

このことは、lnc RNA がこれらの経路を介して細胞増殖やコラーゲン等の細胞外マトリクスの生成に関与している可能性を示唆するものであると考えられた。

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 2 件)

(1) 中島光子、前佛均、ケロイド、Surgery Frontier、査読なし、Vol20、No. 2、2013、印刷中

(2) 中島光子、松本直通、ゲノム多様性と希少疾患、細胞、査読なし、vol145、No. 3、2013、24-27

(3) 中島光子、前佛均、ゲノムワイド関連解析を用いた日本人ケロイド疾患感受性領域の同定、Aesthetic Dermatology、査読有、Vol. 22、No. 2、2012、79-89

〔学会発表〕(計 1 件)

① 中島光子、遺伝的多型に基づくケロイド新規疾患感受性遺伝子の同定および機能解析、日本人類遺伝学会、2012年10月24日～27日、京王プラザホテル(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 光子 (NAKASHIMA MITSUKO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20541965