

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860956

研究課題名(和文) 尋常性乾癬におけるmicroRNAの発現および情報伝達経路解析

研究課題名(英文) The role of the microRNA and the signal pathway in psoriasis

研究代表者

市原 麻子 (ICHIHARA, ASAKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20635784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬の皮膚および血清、毛髪ではいくつかのmicroRNAが乾癬に特異的に発現増加または低下しており、疾患マーカーへの可能性を示した。毛髪においては乾癬の病態に重要なTNF- $\alpha$ を制御するmicroRNAであるmiR-19aなどが増加していた。サンプルとしての血清や毛髪は、患者に対する侵襲が少なく採取可能なので、疾患マーカーとして有用である。乾癬のコントロールとして調べた中毒性表皮壊死症(TEN)では皮膚組織と血清でmiR-18a-5p濃度が上昇し、紅斑やびらん面積と相関した。TENではmiR-18a-5pの過剰発現によりBCL2L10が抑制され、アポトーシスが生じやすい状態になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：There were several overexpressed or suppressed microRNAs specifically in the skin, sera and hair of psoriasis patients. Especially, the hair root miR-19a levels, regulatory microRNA of TNF- $\alpha$ , were significantly up-regulated only in psoriasis compared with normal controls. Investigation of microRNA in psoriasis may lead to a new disease activity marker. Furthermore, we also investigate the microRNAs in severe drug eruptions as controls of psoriasis. Our results indicated that downregulated BCL2L10 caused by miR-18a-5p overexpression mediates intrinsic keratinocyte apoptosis in patients with toxic epidermal necrolysis. Serum miR-18a-5p levels can be a useful disease marker for drug eruptions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 microRNA 薬疹 疾患マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は再発性に経過し、完治することが稀な皮膚疾患である。乾癬の発症にTNF-alpha や IL-17、IL-22、IL-23 などのサイトカインの関連が解明され、これらに対するモノクローナル抗体を利用した生物学的製剤が臨床で効果を上げている。しかし、無効例もあり一概にこれらのサイトカインだけで発症機序を説明できるとは言えない。また、疾患の診断や病勢を反映するようなマーカーはいまだ臨床の場で実用化されているものはなく、診断や病勢を鋭敏に反映する疾患マーカーの早期の開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

我々は、尋常性乾癬において、患者サンプルの中で容易に採取可能な血清および皮膚を用いた疾患マーカーの検討を考えた。ノンコーディング RNA の中でも、microRNA (miRNA) は、ターゲットとなる mRNA に対して相補性を示し、コーディング遺伝子の発現を制御する機能を持つ。皮膚組織および血清中の miRNA 濃度を測定し、発症に関連する miRNA を同定、また疾患マーカーになり得るのかどうか調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 尋常性乾癬および正常、疾患コントロールとして同じ炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎や表皮のアポトーシスを生じる重症薬疹の患者より皮膚組織、血清、毛髪からの miRNA 抽出と miRNA 発現の PCR Array を行った。miRNA 抽出は miRNeasy FFPE kit (Qiagen) や miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen) などを用いて行った。毛髪は毛根と毛幹にわけ、Isogen や Isohair (Nippon Gene) で処理を行い RNA を抽出した。PCR は mir-X miRNA First Strand Synthesis and SYBR qRT-PCR Kit (Takara Bio) などを用いた。miRNA の発現を網羅的に調べる PCR Array 分

析は、ヒトの細胞分化や発育に関連する 88 種の miRNA に対するプライマーがセットされた 96-well RT2 miRNA PCR Array (SA Bioscience) や Human miFinder 384 Array (Qiagen) を用いて行った。同定された miRNA のターゲット遺伝子は、ターゲット遺伝子予測データベースである TargetScan を用いて (version 5.2, <http://www.targetscan.org/>) 抽出し、その中でも病態に関連していると考えられる蛋白の皮膚組織での発現は免疫組織染色で調べた。miRNA の皮膚での発現は In situ hybridization 法を用いた。また miRNA と蛋白発現および情報伝達経路の解析においては、in vitro での培養細胞を用いた miRNA inhibitor や miRNA mimic の transient transfection、また siRNA を用いた蛋白のノックダウンを行った。蛋白の発現を検討するためウエスタンブロット法で蛋白の発現を調べた。

(2) 同定された miRNA について、乾癬の重症度の指標となっている Psoriasis Area Severity Index (PASI) score、病変部の面積である body surface area (BSA) などの臨床所見や好中球、CRP などの検査データとの相関を調べた。重症薬疹に関しても同様の手技で実験を行い、紅斑やびらんの面積、重症度スコアである SCORTEN などとの相関を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 乾癬において、皮膚組織、血清および毛髪の miRNA 濃度を測定し、病態に関連する miRNA を同定、また疾患マーカーへの可能性を検討した。その結果、乾癬の皮膚および血清、毛髪ではいくつかの miRNA が乾癬に特異的に発現増加または低下しており、疾患マーカーへの可能性を示した。

まず乾癬患者の血清においては、miR-125b, miR-146a, miR-203 and miR-205 が低下していた。(図 1)

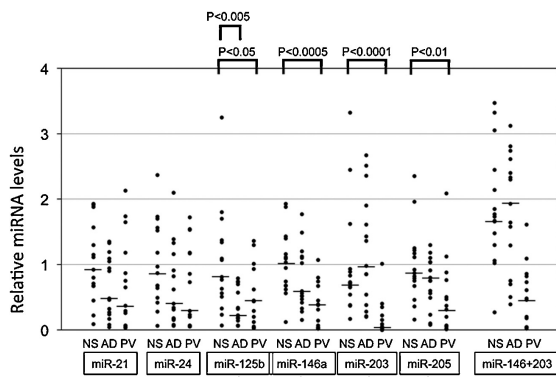


図 1

(2) 以前、乾癬の病変部では MEK1 と cyclin E1 の発現を制御している miR-424 が低下し、MEK1 と cyclin E1 がケラチノサイトの増殖を調整していることを示したが、毛髪においては miR-424 が増加していることが分かった。しかし、毛髪の miR-424 は乾癬の病勢とは関係がなかった。(図 2)

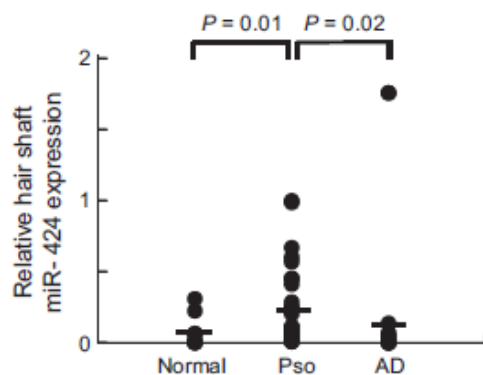


図 2

また乾癬の病態に重要である TNF- $\alpha$  を制御する miRNA である miR-19a も乾癬患者の毛髪では特異的に増加しており、発症から初診までの期間と逆相関していた。サンプルとしての血清や毛髪は、皮膚組織と比較すると患者に対する侵襲が少なく採取可能なので、今後の疾患マーカーとして有用である。その他、乾癬の皮膚組織では miR-15b-3p や miR-21-5p などが増加しており、乾癬の病態と関連があるかについて標的遺伝子を検索予定である。

(3) 現在、乾癬に対する生物学的製剤によって劇的に改善する症例が出てきている。そ

の中のインフリキシマブに良い反応を示した群では、PCR Array、免疫組織染色の結果、ケモカインである CCL22 が増加しており、樹状細胞において CCL22 がインフリキシマブにより抑制され効果が出ていると推測される。CCL22 は乾癬の病態においても重要であると考えられ、これに関連する miRNA を検索することにより治療反応性を予測可能かもしれない。

(4) 乾癬のコントロールとして調べた重症薬疹についても発現している miRNA を検索し、疾患マーカーとして応用可能か模索した。中毒性表皮壊死症 (TEN) は薬剤で生じる重篤な反応であり、角化細胞が急激にアポトーシスに陥る。その結果、皮膚組織では miR-18a-5p 濃度が上昇し(図 3)、培養角化細胞でも miR-18a-5p mimic を遺伝子導入すると、皮膚組織と同様にアポトーシスが増加し、caspase-9 活性が上昇した。また内因性アポトーシスを阻害する BCL2L10 の発現が低下した。Luciferase アッセイにより BCL2L10 が miR-18a-5p の標的蛋白であることも確認した。また血清でも miR-18a-5p 濃度は上昇し、TEN の紅斑やびらんの面積と相関した。血清 miR-18a-5p 濃度は TEN の重症化マーカーになり得ると考えた。つまり TEN では miR-18a-5p の過剰発現により BCL2L10 が抑制され、アポトーシスが生じやすい状態になると考えられた。(図 4) また血清の miR-124 も TEN では上昇しており、びらん面積、SCORTEN と相関していた。

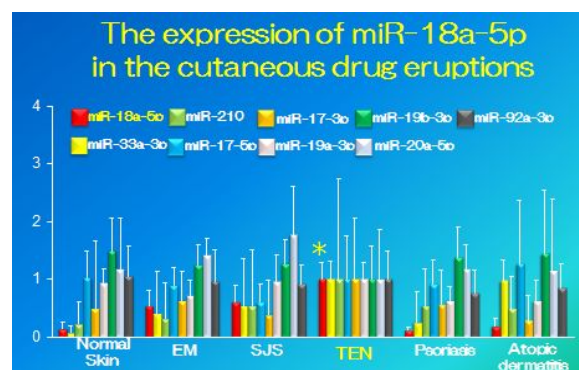


図 3

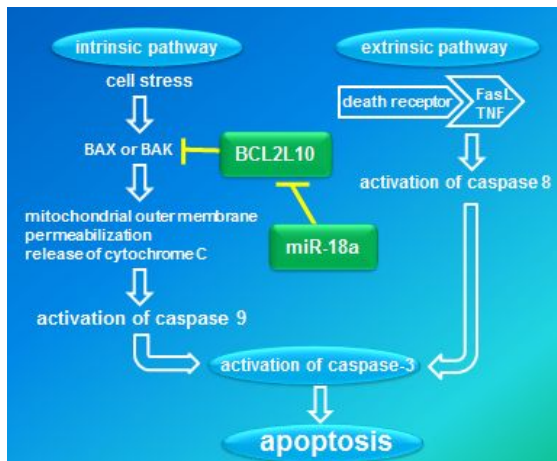


図 4

## 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 5 件)

Increased CCL22 expression in psoriatic skin predicts a good response to infliximab therapy.

Kusumoto S, Kajihara I, Nagamoto E, Makino K, Ichihara A, Aoi J, Johno T, Makino T, Fukushima S, Jinnin M, Ihn H.

Br J Dermatol. 2014 Nov;171(5):1259-61. doi: 10.1111/bjd.13091. 査読有

miR-424 levels in hair shaft are increased in psoriatic patients.

Tsuru Y, Jinnin M, Ichihara A, Fujisawa A, Moriya C, Sakai K, Fukushima S, Ihn H.

J Dermatol. 2014 May;41(5):382-5. doi: 10.1111/1346-8138.12460. 査読有

Analysis of expression pattern of serum microRNA levels in patients with psoriasis.

Koga Y, Jinnin M, Ichihara A, Fujisawa A, Moriya C, Sakai K, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H.

J Dermatol Sci. 2014 May;74(2):170-1. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.01.005. 査読有

Upregulation of miR-18a-5p contributes to epidermal necrolysis in severe drug eruptions.

Ichihara A, Wang Z, Jinnin M, Izuno Y, Shimozone N, Yamane K, Fujisawa A, Moriya C, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H.

J Allergy Clin Immunol. 2014

Apr;133(4):1065-74. doi:

10.1016/j.jaci.2013.09.019. 査読有

Detection of hair root miR-19a as a novel diagnostic marker for psoriasis.

Hirao H, Jinnin M, Ichihara A, Fujisawa A, Makino K, Kajihara I, Sakai K, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H.

Eur J Dermatol. 2013 Nov-Dec;23(6):807-11.

doi: 10.1684/ejd.2013.2190. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Ichihara A, Jinnin M, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H.

Upregulation of miR-18ais associated with keratinocyte apoptosis in toxic epidermal necrolysis.

International Investigative Dermatology 2013年5月8日~11日

エジンバラ、スコットランド

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

市原 麻子 (ICHIHARA, Asako)

熊本大学大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 20635784