

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860886

研究課題名(和文)隆起性皮膚線維肉腫発症に関与するmicroRNAの発現異常とシグナル伝達活性化

研究課題名(英文)The role of microRNAs in the pathogenesis of dermatofibrosarcoma protuberans.

研究代表者

梶原 一亨(Kajihara, Ikko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：90433036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はmicroRNAに着目して隆起性皮膚線維肉腫(DFSP)の病態解明を行った。PCR arrayにより、正常皮膚/皮膚線維腫に比し、DFSP組織ではmiR-205の低発現を認めた。また培養細胞株での検討では正常線維芽細胞(NF)に比し、DFSPではmiR-205の低発現を認め、miR-205の標的蛋白としてLRP-1の関与を検討した。その結果、DFSPの発症機序としてmiR-205の低発現によりLRP-1産生が亢進し、ERKのリン酸化が誘導され、その結果としてDFSPの細胞増殖が起こっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of microRNAs in the pathogenesis of dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP). MicroRNA PCR array showed the expression of miR-205 was down-regulated in DFSP compared with dermatofibroma and normal skin. miR-205 inhibitor increased cell proliferation and low-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP-1) protein in cultured normal dermal fibroblasts. Knockdown of LRP-1 suppressed cell growth and down-regulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation in cultured DFSP cells. Taken together, LRP-1 overexpression caused by the miR-205 down-regulation may play a role in the abnormal proliferation of DFSP cells via directly regulating ERK phosphorylation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：隆起性皮膚線維肉腫 miR-205 LRP-1

1. 研究開始当初の背景

隆起性皮膚線維肉腫(dermatofibrosarcoma protuberans、以下 DFSP)は、切除後しばしば局所再発し、ときに転移をきたす中間群に属する悪性腫瘍である。現在、線維芽細胞の悪性腫瘍である DFSP の発症機序に関して ERK の活性化が関与していることなど少数の報告を認めるのみである。そこで、今回皮膚隆起性皮膚線維肉腫における癌化に関わる microRNA の機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

隆起性皮膚線維肉腫の発症機序を明らかにし、新規診断方法および治療薬の開発へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。研究項目は、隆起性皮膚線維肉腫における microRNA の発現解析 その microRNA が制御し癌化に関与する蛋白質の探索 および で着目した microRNA および蛋白質による皮膚線維芽細胞の癌化メカニズムの検証 診断マーカーもしくは核酸医薬および分子標的薬としての可能性の解析の4つである。

3. 研究の方法

(1) 正常皮膚組織、皮膚線維腫(DF, dermatofibroma)、隆起性皮膚線維肉腫(DFSP, dermatofibrosarcoma protuberans)を比較し、癌化に関与する microRNA を探索する。

(2) 上記 microRNA により制御される蛋白質の DFSP における発現レベルの評価を行う。

(3) 培養細胞を用いて、皮膚線維芽細胞の癌化メカニズムを解明する。

これらの結果を基盤として以下を検討する。

(4) miRNA mimic/inhibitor、siRNA を用いて核酸医薬/分子標的薬としての可能性を検討する。

(5) 癌化に関与する microRNA および蛋白質発現量を解析し、新規マーカーを開発する。

4. 研究成果

(1) DFSP における miRNA 発現量の検討

パラフィン包埋組織を用いて正常皮膚組織、DF、DFSP における miRNA の発現量を PCR array により検討した。種々の microRNA の発現量に差を認めた。正常組織 > DF > DFSP という関係を示した microRNA は miR-23b、miR-96、miR-146a、miR-183、miR-193b、miR-205 であった。このうち、各種悪性腫瘍にて報告のある miR-205 に着目した。

パラフィン包埋組織を用いて正常皮膚組織、DF、DFSP における miR-205 の発現量を in situ hybridization により検討した。正常組織において皮膚線維芽細胞では miR-205 の発現を認めたが、DF および DFSP 腫瘍組織では miR-205 の発現は認めなかった。

(2) miR-205 による LRP-1 蛋白質産生調節 TargetScan (version 6.2, <http://www.targetscan.org/>)を用いて miR-205 が転写後調節する蛋白質を探索し、各種悪性腫瘍にて病態メカニズムに関与する lipoprotein receptor-related protein 1(LRP-1)に注目した。レポーターアッセイにより miR-205 inhibitor が LRP-1 蛋白質産生を活性化することを確認した。

(3) 培養正常皮膚線維芽細胞(NF)に miR-205 inhibitor を用いた検討

NF に miR-205 inhibitor を導入したところ、細胞数の増加を認めた(図 1a)。また western blotting による検討では LRP-1 の増加および ERK のリン酸化亢進を認めた(図 1b)。

図 1a: NF に miR-205 inhibitor 投与時の細胞数の変化

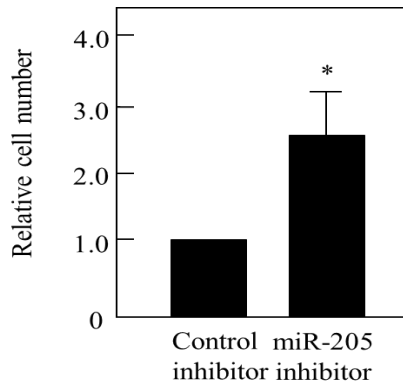
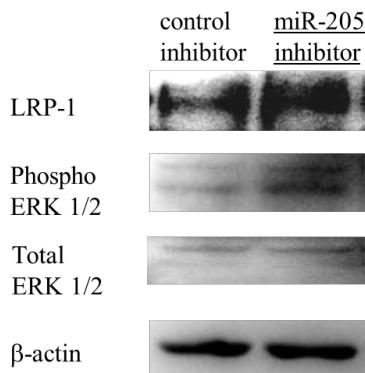


図 1b: NF に miR-205 inhibitor 投与時の LRP-1、ERK、P-ERK の変化



(4) 培養 DFSP 細胞に miR-205 mimic を用いた検討

DFSP に miR-205 mimic を導入したところ、細胞数の減少を認めた(図 2a)。また western blotting による検討では LRP-1 の減少および ERK のリン酸化減弱を認めた (図 2b)。

図 2a : NF に miR-205 inhibitor 投与時の細胞数の変化

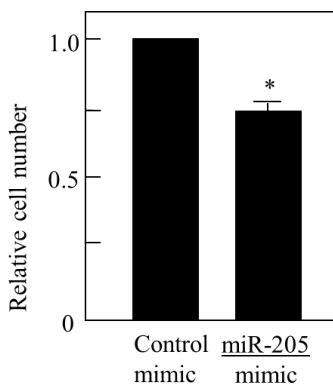
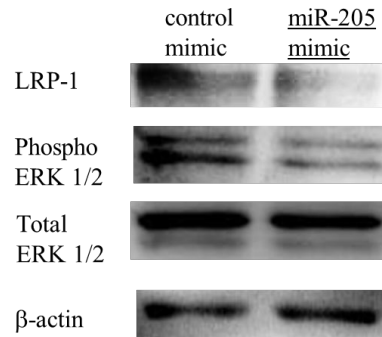


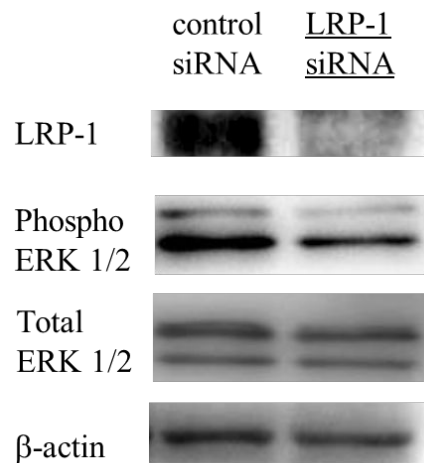
図 2b : NF に miR-205 mimic 投与時の LRP-1、ERK、P-ERK の変化



(5) DFSP における LRP-1 の発現および LRP-1 の役割に関する検討

パラフィン包埋組織を用いて正常皮膚組織、DF、DFSP における LRP-1 の発現量を免疫染色法により検討した。正常組織において皮膚線維芽細胞では LRP-1 の発現を認めなかったが、DF ではわずかに、DFSP 腫瘍組織では強く LRP-1 の発現を認めた。

DFSP における LRP-1 の役割を解明するために siRNA 導入による ERK およびリン酸化 ERK の動態を検討したところ、ERK のリン酸化減弱を認めた (図 3)。

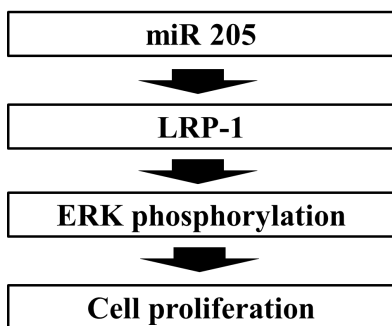


(6) 結果のまとめ (図 4)

DFSP では、miR-205 の低発現による LRP-1 蛋白質産生亢進を認める。その結果、ERK のリン酸化が亢進して細胞増殖が起こっている

と考えられた。

図4：DFSPにおけるmiR-205の役割



<引用文献>

Kajihara I et al. miR-205 down-regulation promotes proliferation of dermatofibrosarcoma protuberans tumor cells by regulating LRP-1 and ERK phosphorylation. Arch Dermatol Res. 2014; 306: 367-74

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22件)すべて査読あり

Ichigozaki, Y., Fukushima, S., Jinnin, M., Miyashita, A., Nakahara, S., Tokuzumi, A., Yamashita, J., Kajihara, I., Aoi, J., Masuguchi, S., Zhongzhi, W. and Ihn, H. Serum long non-coding RNA, snoRNA host gene 5 level as a new tumor marker of malignant melanoma. Exp Dermatol 2016; 25: 67-69. DOI:10.1111/exd.12868.

Wang, Z., Jinnin, M., Kobayashi, Y., Kudo, H., Inoue, K., Nakayama, W., Honda, N., Makino, K., Kajihara, I., Makino, T., Fukushima, S., Inagaki, Y. and Ihn, H. Mice overexpressing integrin α v in fibroblasts exhibit dermal thinning of the skin. J Dermatol Sci. 2015; 79: 268-78 DOI:10.1016/j.jdermsci.2015.06.008.

Shimozono, N., Jinnin, M., Masuzawa, M.,

Wang, Z., Hirano, A., Tomizawa, Y., Etoh-Kira, T., Kajihara, I., Harada, M., Fukushima, S. and Ihn, H. NUP160-SLC43A3 is a novel recurrent fusion oncogene in angiosarcoma. Cancer Res 2015 ; 75: 4458-4465. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0418.

Sawamura, S., Kajihara, I., Ichihara, A., Fukushima, S., Jinnin, M., Yamaguchi, E., Kohrogi, H. and Ihn, H. Crizotinib-associated erythema multiforme in a lung cancer patient. Drug Discov Ther 2015; 9: 142-143. DOI:10.5582/ddt.2015.01019.

Nakamura, K., Nakatsuka, N., Jinnin, M., Makino, T., Kajihara, I., Makino, K., Honda, N., Inoue, K., Fukushima, S. and Ihn, H. Serum concentrations of Flt-3 ligand in rheumatic diseases. Biosci Trends 2015; 9: 342-349. DOI: 10.5582/bst.2015.01121.

Nakamura, K., Jinnin, M., Kudo, H., Inoue, K., Nakayama, W., Honda, N., Kajihara, I., Masuguchi, S., Fukushima, S. and Ihn, H. The role of PSMB9 up-regulated by interferon signature in the pathophysiology of cutaneous lesions of dermatomyositis and lupus erythematosus. Br J Dermatol. Epub. DOI:10.1111/bjd.14385.

Kudo, H., Wang, Z., Jinnin, M., Nakayama, W., Inoue, K., Honda, N., Nakashima, T., Kajihara, I., Makino, K., Makino, T., Fukushima, S. and Ihn, H. EB13 Downregulation Contributes to Type I Collagen Overexpression in Scleroderma Skin. J Immunol 2015; 195: 3565-3573. DOI: 10.4049/jimmunol.1402362.

Koga, A., Kajihara, I., Yamada, S., Makino, K., Ichihara, A., Aoi, J., Makino, T., Fukushima, S., Jinnin, M. and Ihn, H.

Enhanced CCR9 expression levels in psoriatic skin are associated with poor clinical outcome to infliximab treatment. *J Dermatol*. Epub. DOI:10.1111/1346-8138.13178.

Kanemaru, H., Kajihara, I., Yamanaka, K., Igata, T., Makino, T., Masuguchi, S., Fukushima, S., Jinnin, M. and Ihn, H. Platelet-rich plasma therapy is effective for the treatment of refractory skin ulcers in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2015; 25: 660-661. DOI:10.3109/14397595.2014.924204.

Kajihara, I., Maeda, S., Yamada, S., Izumi, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Jinnin, M. and Ihn, H. Biweekly gemcitabine therapy induces complete remission in cutaneous angiosarcoma resistant to multiple anticancer drugs. *J Dermatol* 2015; 42: 1197-1198. DOI:10.1111/1346-8138.13077

Kajihara, I., Kanemaru, H., Miyake, T., Aoi, J., Masuguchi, S., Fukushima, S., Jinnin, M. and Ihn, H. Combination chemotherapy with S-1 and docetaxel for cutaneous angiosarcoma resistant to paclitaxel. *Drug Discov Ther* 2015; 9: 75-77. DOI:10.5582/ddt.2015.01005.

Sakoguchi, A., Nakayama, W., Jinnin, M., Wang, Z., Yamane, K., Aoi, J., Makino, K., Kajihara, I., Ichihara, A., Makino, T., Fukushima, S., Sakai, K., Inoue, Y. and Ihn, H. The expression profile of the toll-like receptor family in scleroderma dermal fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32(6 Suppl 86): S-4-9.

Okada, Y., Jinnin, M., Makino, T., Kajihara, I., Makino, K., Honda, N., Nakayama, W., Inoue, K., Fukushima, S. and Ihn, H. MIRSNP rs2910164 of miR-146a is

associated with the muscle involvement in polymyositis/dermatomyositis. *Int J Dermatol* 2014; 53: 300-304.

Makino, T., Jinnin, M., Etoh, M., Yamane, K., Kajihara, I., Makino, K., Ichihara, A., Igata, T., Sakai, K., Fukushima, S. and Ihn, H. Down-regulation of microRNA-196a in the sera and involved skin of localized scleroderma patients. *Eur J Dermatol* 2014; 24: 470-476. DOI:10.1684/ejd.2014.2384.

Makino, K., Jinnin, M., Makino, T., Kajihara, I., Fukushima, S., Inoue, Y. and Ihn, H. Serum levels of soluble carbonic anhydrase IX are decreased in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis compared to those with limited cutaneous systemic sclerosis. *Biosci Trends* 2014; 8: 144-148.

Makino, K., Jinnin, M., Aoi, J., Kajihara, I., Makino, T., Fukushima, S., Sakai, K., Nakayama, K., Emoto, N., Yanagisawa, M. and Ihn, H. Knockout of endothelial cell-derived endothelin-1 attenuates skin fibrosis but accelerates cutaneous wound healing. *PLoS One* 2014; 9: e97972. DOI:10.1371/journal.pone.0097972.

Kusumoto, S., Kajihara, I., Nagamoto, E., Makino, K., Ichihara, A., Aoi, J., Johno, T., Makino, T., Fukushima, S., Jinnin, M. and Ihn, H. Increased CCL22 expression in psoriatic skin predicts a good response to infliximab therapy. *Br J Dermatol* 2014; 171: 1259-1261. DOI:10.1111/bjd.13091.

Kudo, H., Jinnin, M., Asano, Y., Trojanowska, M., Nakayama, W., Inoue, K., Honda, N., Kajihara, I., Makino, K., Fukushima, S. and Ihn, H. Decreased interleukin-20 expression in scleroderma skin contributes to cutaneous fibrosis.

Arthritis Rheumatol 2014; 66: 1636-1647.
DOI:10.1002/art.38380.

Kanemaru, H., Jinnin, M., Asao, K., Ichihara, A., Makino, K., Kajihara, I., Fujisawa, A., Fukushima, S. and Ihn, H. A case of psoriasis accompanied by arthritis after delivery. Biosci Trends 2014; 8: 64-67.

Kajihara, I., Makino, K., Ichihara, A., Fukushima, S., Jinnin, M., Hirooka, S., Kojima, K., Kouroggi, H. and Ihn, H. Immunoglobulin G4-related disease in a psoriasis vulgaris patient treated with ustekinumab. J Dermatol 2014; 41: 670-671.
DOI:10.1111/1346-8138.12528.

① Kajihara, I., Jinnin, M., Yamada, S., Ichihara, A., Makino, T., Igata, T., Masuguchi, S., Fukushima, S. and Ihn, H. Successful treatment of skin fistulas in systemic sclerosis patients with the combination of topical negative pressure therapy and split-thickness skin grafting. Mod Rheumatol 2014; 24: 374-376. DOI: 10.3109/14397595.2013.854065.

② Kajihara, I., Jinnin, M., Harada, M., Makino, K., Honda, N., Makino, T., Igata, T., Masuguchi, S., Fukushima, S. and Ihn, H. miR-205 down-regulation promotes proliferation of dermatofibrosarcoma protuberans tumor cells by regulating LRP-1 and ERK phosphorylation. Arch Dermatol Res 2014; 306: 367-374.
DOI:10.1007/s00403-014-1452-z.

〔学会発表〕(計2件)

梶原一亨、神人正寿、福島聡、尹浩信。隆起性皮膚線維肉腫の発症における microRNA の役割。第 113 回日本皮膚科学会総会。2014 年 5 月 31 日。京都府

梶原一亨、泉加奈子、増口信一、福島聡、

神人正寿、尹浩信。Biweekly gemcitabine 療法にて長期 CR が得られている頭部血管肉腫の 1 例。第 31 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会。2015 年 7 月 3 日。大阪府

〔図書〕(計1件)

梶原一亨、牧野貴充、神人正寿。日本臨床社。免疫症候群(第2版)II 好酸球性筋膜炎、2016、253-6

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/dermplas/>

6. 研究組織

(1)研究代表者: 梶原一亨 (KAJIHARA Ikko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教
研究者番号: 90433036

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし