

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870444

研究課題名(和文)疾患マーカーとしての毛根・毛髪中microRNAの検討

研究課題名(英文)Investigation of microRNA in hair root and hair as a disease marker

研究代表者

伊方 敏勝(Igata, Toshikatsu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90423673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に有用な診断/治療マーカーがまだ見いだされていない疾患において毛根・毛髪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行い、毛根・毛髪microRNAが各疾患のマーカーとなりうるかどうかを検討した。皮膚筋炎や乾癬において有意に上昇を認め、疾患のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the diseases in which clinically useful diagnostic / therapeutic markers have not yet been found, we measured the root hair / hair microRNA concentration, compared with the normal control group and examined the correlation with clinical symptoms, and found that hair roots / It was examined whether it could be a marker. Significant elevation was observed in dermatomyositis and psoriasis, suggesting the possibility of being used as a biomarker of disease.

研究分野：形成外科学

キーワード：microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

臨床的に有用な診断/治療マーカーがいまだ見いだされていない疾患が皮膚科/形成外科領域においても数多く存在する。そこでそのような疾患において毛根・毛髪 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行い、毛根・毛髪 microRNA が各疾患のマーカーとなりうるかどうかを検討したい。毛根・毛髪は非侵襲かつ簡単に採取できるという点で血液や生検材料等と比較しても有用である。さらにそれぞれの疾患で特異的に増減している microRNA に注目しその機能解析を行う計画である。

## 2. 研究の目的

### 研究の学術的背景

#### 皮膚疾患と疾患マーカー；現状の問題点

分子生物学的メカニズムが解明されつつあるにもかかわらず臨床的に有用な診断/治療マーカーが見いだされていない疾患は皮膚科/形成外科領域においてもいまだ数多く存在する。たとえば全身性強皮症では transforming growth factor (TGF)-beta が I 型コラーゲン遺伝子の転写を恒常的に活性化していると考えられている (Ihn H, J Dermatol Sci. 2008) が、TGF-beta の血中濃度は本症で特異的に増減していたり本症の病勢に鋭敏に連動しているわけではなく、今日まで本症に特異的な診断マーカーや皮膚硬化の病勢を反映するマーカーは確立されていない。

#### 疾患マーカーとしての血清 microRNA 濃度

最近、我々は血液および血清が患者サンプルの中で最も取得しやすい検体である事を考慮し、血清中の microRNA 濃度が様々な皮膚疾患の診断あるいは病勢マーカーとなる可能性を検討している (図 1)。microRNA は細胞外でもエキソソームと呼ばれる膜の構造体に包まれ RNAase から保護されているため血清中に微量ながら安定して存在しており、それらを抽出・精製し測定する事で悪性腫瘍をはじめとする様々な疾患において有用な腫瘍マーカーとなる事がすでに示されている (Zhu W, et al. BMC Research Note 2009)。我々はこれまで皮膚科領域において強皮症患者の血清 miR-92a 濃度や乾癬患者の miR-1266 濃度が臨床的に有用なマーカーとなりうる事を報告した (Sing T, et al. Rheumatology 2012, Ichihara A, et al. Eur J Dermatol. 2012)。

#### 本プロジェクトの目的；毛根および毛髪中の microRNA の研究

今回我々は microRNA がエキソソームにより保護されて細胞外で安定に存在しているのであれば、毛根、あるいは細胞成分がほとんど存在しない毛髪にも microRNA が存在し、その発現量がなんらかの疾患マーカーになるのではないかと仮説を立てた。毛髪中に

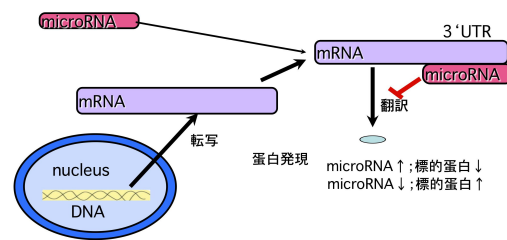


図 1. タンパク質をコードしていない non coding RNA の一種で平均 22 塩基程度の長さを持つ microRNA は様々な mRNA の 3' UTR の相補的配列に結合し遺伝子の翻訳を阻害する事で遺伝子発現を調節している。ヒトゲノムには現在 2500 種類弱の microRNA が存在し、60% 以上の遺伝子を制御しようと考えられている (Friedman RC et al. Genome Res. 2009)。microRNA が生体内で遺伝子発現を調節することで各疾患の病態において様々な役割を果たしている事も判明しつつある。例えば強皮症では miR-29a の発現が低下しており、標的であるコラーゲン遺伝子を増加させることで線維化を促進していることが近年明らかになった (Maurer B, et al. Arthritis Rheum. 2010)。

microRNA が存在する事はすでに確認されており (Lefkowitz GK, et al. Plos one 2011)、我々もまた毛髪を溶かす事で microRNA を抽出することができ (図 2)、また血清・毛根および毛髪中の microRNA 量はそれぞれ相関せず、独立した新しい疾患マーカーとなりうる事を報告している (Wang Z, et al. J Dermatol Sci 2013)。そこで本研究計画において、我々は毛根・毛髪中の microRNA が様々な皮膚疾患のマーカーになる可能性を確かめたい。



図 2. (左) Isohair で毛髪を溶解する前  
(右) 溶解後

期間内に明らかにすること  
研究代表者は研究期間内に以下のテーマについての実験を計画している。

- ・ 毛根および毛髪から効率的に microRNA を抽出する手法を開発する
- ・ 悪性腫瘍の患者および膠原病患者や炎症性皮膚疾患患者の毛根および毛髪における様々な microRNA の発現を正常対照群や他の疾患群と比較し、疾患マーカーとしての有用性を評価する
- ・ さらに各疾患で特異的に増減している microRNA に注目しその機能解析を行う。まず最初に、これまで報告されている毛根・

毛髪からの microRNA 抽出方法と新たな試薬 / 手法を用いた方法で抽出率などを比較し、もっとも効率の良い抽出方法を検討する。

その間、多数の患者群および対照群より毛根・毛髪の total microRNA を抽出する。次に各 microRNA の毛根・毛髪中濃度を患者群と正常対照群・他疾患群で比較し、さらに患者群において臨床症状との相関を見る。

最後に、各疾患で特異的に増減している microRNA に注目しその機能解析を行う。各 microRNA やそれに対する阻害剤を培養細胞あるいはマウスに投与し生じる変化を観察することで、病態への関与および治療への応用の可能性を明らかにする予定である。

#### 本研究の特色・意義

毛根・毛髪中の microRNA の臨床マーカーとして意義についての研究はこれまで他施設では行われていない。一方、我々はすでに様々な皮膚疾患患者の毛根・毛髪を蓄積し始めており、同時にそのような患者の臨床所見や検査所見のデータベースを構築している。学術的な面のみならず実現性においても本プロジェクトは十分な独自性を有していると考えられる。

予想される結果として、microRNA が生体内に約 2500 種類存在しうる事を考慮するといずれかの microRNA が各疾患の診断や病勢と相関する可能性が高く、本プロジェクトによって **各疾患のマーカーが見いだされる確率はきわめて高い**。本プロジェクトの意義としては第一に、毛根・毛髪は **血清よりもさらに簡便に採取できる生体マーカー** となりうる（例；新生児でのいちご状血管腫の診断を VEGF receptor に関わる microRNA の量を測定して診断するなど）(Jinnin M, et al. Nat Med 2008)。第二に、RNA が蛋白の上流に存在し一般に刺激に対し迅速に反応する事を考えると、**より鋭敏な全く新しい疾患マーカーの開発**につながると思われる。第三に、本プロジェクトによって各疾患において病変部で発現が変化している microRNA についてはその発現の程度を毛根・毛髪から簡便に把握できるようになる可能性があるが、それ以外の microRNA についてもその発現異常からさかのぼり、**新たな病態の解明**につながる可能性もある。最後に、そのような毛根・毛髪中の microRNA における変化は単なる結果ではなく病因に関与している可能性があるが、そのような microRNA を（microRNA mimic あるいは inhibitor を用いて）特異的に補充あるいは阻害する事で、**疾患の治療につながる可能性**もある。

### 3. 研究の方法

平成 26 年度は、正常人由来の少数の毛根・毛髪サンプルから様々な市販のキットを用いて total microRNA を抽出し、これまで報告されている方法と抽出率などを比較してもっとも効率の良い抽出方法を検討する。同時に多数の患者から毛髪を採取し蓄積する。

平成 27 年度以降は多数のサンプルから microRNA を抽出し、疾患群での microRNA 濃度を正常群や他疾患群と比較し臨床症状との相関を調べることで、疾患マーカーとしての有用性を評価する。さらに疾患群で変化している microRNA に注目し、その機能解析をおこない治療への応用を模索する。

#### ・平成 26 年度の計画

平成 26 年度は、少数の正常人由来毛根・毛髪サンプルから様々な市販のキットを用いて total microRNA を抽出し、既報告の方法とその効率を比較する。平行して、皮膚科・形成再建科を受診した様々な疾患の患者（特に悪性黒色腫など皮膚悪性腫瘍、強皮症など膠原病、尋常性乾癬など炎症性皮膚疾患、それぞれ 20 人以上を予定）より文書による同意を得て毛根および毛髪を採取し、-80 度フリーザーに保存していく。既に倫理委員会の承認は取得済みである。

#### ・平成 27 年度以降の計画

平成 27 年度以降は、各疾患患者（特に悪性黒色腫など皮膚悪性腫瘍、強皮症など膠原病、尋常性乾癬など炎症性皮膚疾患、それぞれ 20 人以上を予定）より採取し保存した毛根・毛髪より total microRNA を抽出する。すでに病変部で発現が変化している事が知られている microRNA や各疾患で重要な働きをしている蛋白を制御しうる microRNA をリストアップし、それらが実際に毛根・毛髪中に発現しているかをまず少数のサンプルを用いて確認する。

そして毛根・毛髪中での発現が確認された microRNA については、多数の患者群で毛根・毛髪 microRNA 濃度を測定し、正常対照群や他疾患との比較を行う。さらに患者群においては臨床症状との相関を見る。具体的には、全身性強皮症においては modified Rodnan total skin thickness score や皮膚潰瘍・肺病変・腎病変の有無との相関、尋常性乾癬については Psoriasis Area Severity Index (PASI) score や body surface area (BSA) との比較を行う。

その後、さらに各疾患で特異的に増減している microRNA に注目しその機能解析を行う。各 microRNA やそれに対する阻害剤を培養細胞あるいはマウスに投与し生じる変化を観察することで病態への関与の様式および治療への応用の可能性を明らかにする。

### 4. 研究成果

皮膚筋炎患者の毛幹における miR-214 のレベルは、健常被験者および強皮症患者のレベルよりも有意に高かった。症状発現と病院への最初の来院との間の期間は、上昇した毛幹 miR-214 レベルを有する患者において有意により短く、より重度の主観的症状を有することを示唆した。

乾癬患者における miR-424 は、正常被験者 (P = 0.0174) およびアトピー性皮膚炎患者 (P =

0.0216)と比較して有意に増加した(図3)。

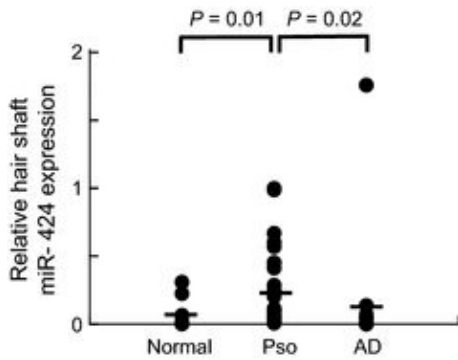


図3 乾癬患者および正常被験者におけるmiR-424の毛幹濃度

今回の研究は毛幹および毛根におけるmicroRNAレベルが疾患のバイオマーカーになる可能性を示唆した。

#### 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. microRNA level is raised in the hair shafts of patients with dermatomyositis in comparison with normal subjects and patients with scleroderma. *Int J Dermatol.* 2016 Jul;55(7):786-90. DOI:10.1111/ijd.12958 査読有

2. miR-424 levels in hair shaft are increased in psoriatic patients *J Dermatol.* 2014 May;41(5):382-5. doi: 10.1111/1346-8138.12460. 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊方 敏勝 (IGATA, Toshikatsu )  
熊本大学大学院生命科学研究部・皮膚病態  
治療再建学分野・助教  
研究者番号：90423673

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )