

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09638

研究課題名(和文) 乳幼児アトピー性皮膚炎の発症に関わるmicroRNAの解析

研究課題名(英文) Analysis of microRNAs related to the development of infantile atopic dermatitis

研究代表者

井上 祐三郎 (Inoue, Yuzaburo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：00456063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乳幼児アトピー性皮膚炎に焦点をあて、microRNA(miRNA)発現の個体差による転写後制御の違いから、新たな発症病態を解明することを目的とした。1才時にアトピー性皮膚炎がある児の臍帯血で発現が上昇していたhas-mir-144-3p(miR-144)は、総IgE値とは関連しなかった。表皮角化細胞へのmiR-144導入はABCA1発現を低下させ、ダニ刺激下において、NF- $\kappa$ B活性化を介して誘導されるhBD-2発現を亢進させた。hBD-2はマスト細胞の脱顆粒を誘導することから、臍帯血におけるmiR-144発現の上昇は乳幼児アトピー性皮膚炎の病態に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that the microRNA, hsa-miR-144-3p(miR-144), is highly expressed in the umbilical cord serum of infants who developed AD at 1 year of age. This change was not evident in maternal serum or at 1 year of age. The miR-144 levels did not correspond to the serum IgE levels at 1 year of age as well. Mir-144 targets ABCA1 and led to a decrease in ABCA1 levels and cholesterol accumulation in miR-144-transfected human primary epithelial keratinocytes. In response to house dust mite (HDM) stimulation, miR-144-transfected keratinocytes showed an increase in the translocation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit. HDM stimulation also led to an increase in the mRNA levels of human beta defensin-2, which has been shown to promote mast cell degranulation, following miR-144 transfection of keratinocytes. These findings suggest that high levels of miR-144, compounded via NF- $\kappa$ B activation maybe an early atopy-independent trigger for the development of AD at 1 year of age.

研究分野：アレルギー

キーワード：アトピー性皮膚炎 microRNA 表皮角化細胞 コホート研究

## 1. 研究開始当初の背景

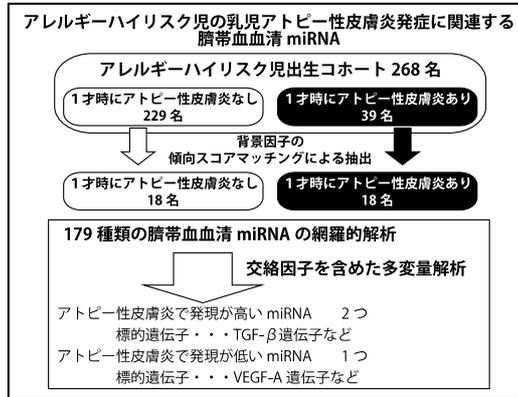
アトピー性皮膚炎(AD)は多因子性疾患であり、数々の遺伝因子と環境因子の検討が行われてきたが、発症のメカニズムは未だ明らかでない。遺伝因子と環境因子を詳細に検討するためには、出生時からの追跡により疾患の発症を観察し、経時的に母体および児の情報を得ることができる出生コホート研究が必要となる。

MicroRNA(miRNA)は20-21塩基からなる1本鎖RNAであり、特定の遺伝子のmRNAの3'UTRに相補的に結合することで、mRNAの転写抑制や分解を誘導する。腫瘍をはじめとした様々な疾患において、特徴的なmicroRNA発現が認められることから、microRNAは病態に関連する遺伝子発現の転写後制御に働くことが示唆されている。近年、microRNAは細胞内だけでなく、様々な体液中に存在するエクソソーム中に存在する(分泌microRNA)ことが明らかになっており、より簡便に評価できることから、その解析は病態解明につながるだけでなく、疾患の新たなバイオマーカーとなることが期待されている。

<予備実験：アレルギーハイリスク児コホートにおける臍帯血血清miRNAの検討>

およそ1000種類あるヒトmiRNAから、乳幼児アトピー性皮膚炎と関連する可能性のあるmiRNAを絞り込むために、連携研究者の下条直樹が行っているアレルギーハイリスク児出生コホート研究の臍帯血血清を用いて予備実験を行った。両親あるいは兄妹にアレルギー疾患がある268名において、1才時に39名の児が医師によりアトピー性皮膚炎と診断された。母親および児の背景因子をふまえた傾向スコアマッチング法により、1才時にアトピー性皮膚炎がある児18名とない児18名を抽出した。対象の臍帯血血清からmiRNAを抽出し、179種類のmiRNA発現を網羅的にreal-time PCRで測定した。

アトピー性皮膚炎の発症に関連する交絡因子を含めた多変量解析により、1才時にアトピー性皮膚炎がある児で発現が上昇している2種類のmiRNA、発現が低下している1種類のmiRNAを同定した(以後ADmiRs-HRと略す)。予備実験による検討から、臍帯血血清中のADmiRs-HRは、乳幼児アトピー性皮膚炎発症予測マーカーとなる可能性が考えられ、またADmiRs-HRにより遺伝子発現制御が、乳幼児アトピー性皮膚炎の病態に関わることが示唆された。



## 2. 研究の目的

本研究では、出生コホート研究によって発症を観察できる乳幼児アトピー性皮膚炎に焦点を当て、miRNA発現の個体差による遺伝子の転写後制御の違いから、乳幼児アトピー性皮膚炎の新たな発症病態を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ADmiRs-HRの中から、1才時にアトピー性皮膚炎がある児で発現が上昇しているhas-mir-144(miR-144)について、乳幼児アトピー性皮膚炎の病態との関連を検討した。

<臍帯血miR-144発現とアトピー素因の関連の検討>

miR-144が、アトピー性皮膚炎の重要な発症寄与因子の一つであるアトピー素因と関連するか否かを検討するために、臍帯血miR-144発現量と、1歳時の血清総IgE値の関連を検討した。

<miR-144の標的遺伝子発現制御および細胞機能の変化の検討>

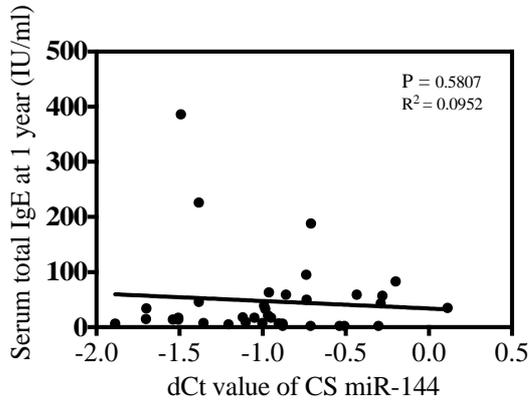
miR-144による遺伝子発現制御のメカニズムを明らかにし、乳幼児アトピー性皮膚炎の病態における役割を明らかにすることを目的に、miR-144をアトピー性皮膚炎の病態に重要な表皮角化細胞に遺伝子導入し、標的遺伝子発現の変化と細胞機能の変化を検討した。

## 4. 研究成果

<臍帯血miR-144発現とアトピー素因の関連の検討>

臍帯血miR-144発現量と、1歳時の血清総IgE値の間には、有意な関連は認めなかった。このことから、臍帯血中のmiR-144は、アトピー素因とは関連なく、1才時のアトピー性皮膚炎の発症に寄与することが示唆された。

臍帯血 miR-144 発現量と1歳時の血清総 IgE

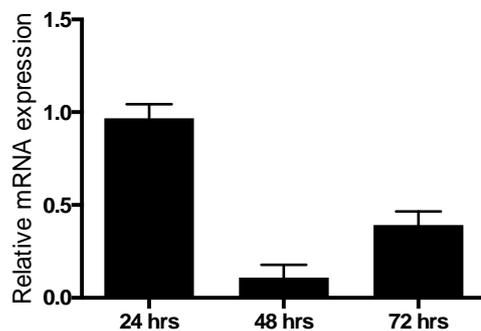


< miR-144 の標的遺伝子発現制御および細胞機能の変化の検討 >

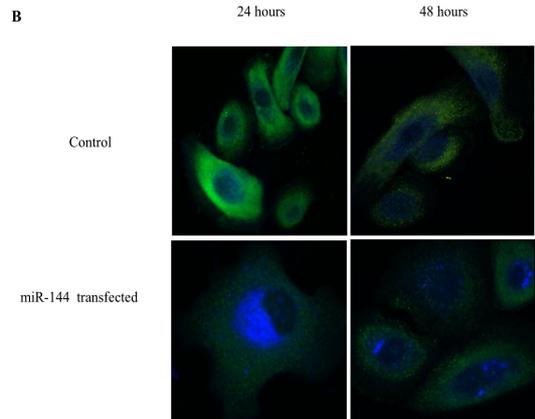
MicroRNA の標的遺伝子予測プログラムである MicroRNA.org、TargetScan、および miRBase を用いたところ、miR-144 の候補標的遺伝子として、ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) が挙げられた。過去の報告では、ABCA1 は細胞からのコレステロール流出に関与し、miR-144 は ABCA1 発現を抑制することで、細胞内のコレステロールの蓄積をもたらすことが示されている。表皮角化細胞における ABCA1 の発現と、それに対する miR-144 の影響を検討するために、miR-144 を遺伝子導入し、ABCA1 の発現を調べた。

その結果、MiR-144 導入表皮角化細胞では、ABCA1 の mRNA およびタンパク質発現の低下が認められた。また、miR-144 導入表皮角化細胞では、細胞内コレステロールの蓄積が認められた。

MiR-144 導入による ABCA1 mRNA の低下



MiR-144 導入による細胞内コレステロール蓄積の低下

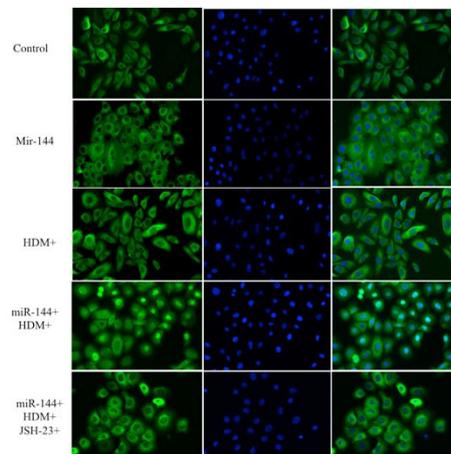


緑色：ABCA1  
青色：コレステロール

ABCA1 をノックアウトしたマクロファージでは、TLR アゴニストに対するコレステロールの蓄積および過剰なサイトカイン応答を引き起こすことが報告されている。これは、MyD88 依存性 TLR (TLR2,4,7 および 9) の脂質ラフトへの移行の促進による下流シグナルの増強と、NF-κB およびアクチベータータンパク質-1 (AP-1) シグナルを介した向炎症性サイトカイン産生の増強によるものと考えられている。

ABCA1 の発現の抑制が認められた miR-144 導入表皮角化細胞において、AD における炎症誘因因子であるダニ (HDM) 刺激に対する反応を検討したところ、miR-144 導入によって、HDM 刺激による NF-κB p65 サブユニットの核内移行の増強が認められた。このことから、miR-144 により、NF-κB を介した細胞応答が、亢進する可能性が考えられた。

MiR-144 導入による HDM 刺激による NF-κB p65 サブユニットの核内移行の増強

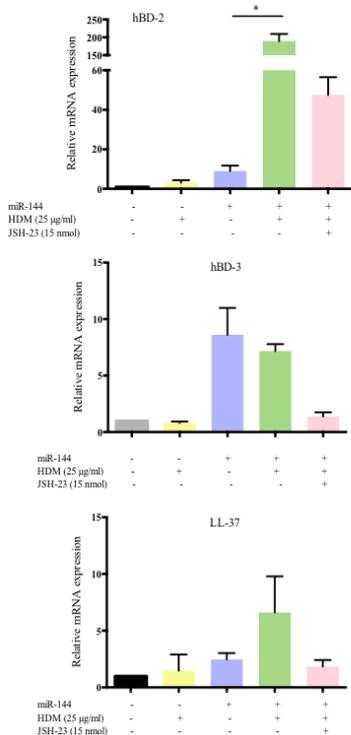


緑色：NF-κB p65  
青色：DAPI

MiR-144 導入表皮角化細胞では、NF-κB 活性化に応答した向炎症性サイトカイン産生認めなかったため、次に NF-κB 活性化を介して AD の病因に關与する他の分子について検討した。

Anti-microbial peptide (AMP) は上皮に存在する、直接の抗菌活性を示す小さなカチオン性ペプチドであり、抗原提示、サイトカイン放出およびバリア機能の回復にも役割を果たすことが示されている。AD に關与する AMP には、誘導性  $\beta$  デフェンシン hBD-2 および  $\alpha$ 、およびカテリシジン LL-37 が含まれる。過去の報告では、AD の慢性病変と比較して、急性病変において AMP の分泌が増加することが示されている。また、hBD は、表皮角化細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導し、マスト細胞の化学誘引物質として作用し、掻痒誘発メディエーターの放出を誘発し、血管透過性を増加させることが知られている。hBD 2 レベルは、非病変皮膚と比較して病変角質層で有意に高いことが示され、SCORing of Atopic Dermatitis (SCORAD) と trans-epidermal water loss (TEWL) のスコアリングと相関する。

そこで、miR-144 導入による、ヒト表皮由来初代角化細胞を HDM で刺激した際の hBD-2 の mRNA 発現の変化を検討したところ、hBD-2 発現は有意に増加した。また、HDM に加えて NF-κB 阻害剤 JSH-23 を追加すると、hBD-2 発現量が抑制された。hBD-3 および LL-37 mRNA レベルは、HDM 刺激に際して有意に変化しなかった。hBD-2 産生は NF-κB 活性化により増加することがこれまで示されており、hBD-2 発現の増加は、NF-κB 活性化を介している可能性が考えられた。



以上の結果から、1 才時にアトピー性皮膚炎がある児の臍帯血で発現が上昇していた miR-144 は、表皮角化細胞の ABCA1 発現を低下させ、HDM 刺激による NF-κB 活性化を介して誘導される hBD-2 発現を亢進させ、アトピー素因とは独立に、乳幼児アトピー性皮膚炎の病態に關与する可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① Dissanayake E, Inoue Y. MicroRNAs in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 査読あり、16(9)、2016、67  
DOI: 10.1007/s11882-016-0648-z

〔学会発表〕(計 1 件)

① Inoue Y, Dissanayake E, Nakano T, Kudo K, Misumi S, Ide T, Yamamoto T, Chiba K, Yamaide F, Yamaide A, Arima T, Tomiita M, Hoshioka A, Shimojo N. Serum microRNAs as novel biomarkers in childhood asthma. Young Investigator Exchange Program, The annual conference of KAPARD 2016 年 4 月 9 日 Muju, Korea

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 祐三郎 (INOUE, Yuzaburo)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師  
研究者番号：00456063

### (3) 連携研究者

下条 直樹 (SHIMOJO, Naoki)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：40221303

山出 史也 (YAMAIDE, Fumiya)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50636199

中野 泰至 (NAKANO, Taiji)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90708306

### (4) 研究協力者

Eishika Dissanayake (Eishika Dissanayake)