

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09771

研究課題名(和文) 全身性強皮症を含む皮膚線維化疾患における long non-coding RNA

研究課題名(英文) the role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of sclerodermic skin diseases

研究代表者

神人 正寿 (Jinnin, Masatoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60401048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：平成27年度は、TSIXが強皮症患者の病変部皮膚で他の疾患や正常皮膚よりも発現が増加しており、さらにその局在は皮膚線維細胞であることを突き止めた。また、TSIX siRNAによりcollagen mRNAの安定性が有意に減少した。そして平成28年度は、多数の強皮症患者群で血清TSIX濃度を測定したところ、正常対照群に比較して強皮症患者群で有意に増加していたため診断に有用である可能性が示唆された。平成29年度は皮膚線維化モデルマウスにおいてTSIXを阻害して、生じる変化を観察した。その結果、TSIX siRNAはブレオマイシンによる皮膚真皮厚の増加を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：We tried to evaluate the expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) in scleroderma patients and determined whether lncRNAs controls collagen expression in dermal fibroblasts. lncRNA expression was examined by real-time PCR and in situ hybridization. We found one of the lncRNAs, TSIX, was overexpressed in scleroderma dermal fibroblasts both in vivo and in vitro. TSIX siRNA decreased the mRNA expression of type I collagen in normal and scleroderma dermal fibroblasts. Furthermore, TSIX siRNA significantly reduced type I collagen mRNA stability, but not protein half-lives. We first showed that serum TSIX levels were significantly increased in scleroderma patients. TSIX siRNA also attenuated the dermal thickening induced by bleomycin injection. Our study demonstrated that TSIX plays a role in the pathogenesis of scleroderma, and may become a key molecule to develop novel diagnostic tool or therapeutic approach.

研究分野：皮膚科学

キーワード：膠原病 全身性強皮症 RNA

1. 研究開始当初の背景

ヒトの細胞には蛋白質をコードしていない non-coding RNA が存在し、小分子 RNA を主体とするものと比較的長い RNA を主体とするものに分類される。前者の代表が small nuclear RNA・small nucleolar RNA および microRNA であり、なかでも平均 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調節をしている。ヒトゲノムには 2000 種類程度の microRNA が存在するが、近年 microRNA 関連の研究論文は急速に増加している。

一方、200 塩基以上の長さを有しゲノム中の様々な領域から転写される long non-coding RNA (lncRNA) は、胚の分化や体軸方向の形成など発生過程の調節因子として見いだされた(Wang KC, et al. Mol Cell 2011)。デコイや情報伝達、あるいは足場やガイド分子としての機能を有すると考えられる。最近の実験機器の進歩により比較的簡単に検出できるようになり、microRNA よりも多い約 3 万個の lncRNA の存在が示唆されている。にもかかわらず Pubmed 上での lncRNA 関連の論文は microRNA に比べてかなり少なく、しかもそのほとんどが基礎研究である。これまでアルツハイマー病および癌などでその異常発現が観察されているものの(Bhan A, et al. ChemMedChem 2014)、ヒト疾患に関連した研究はまだ少ない。

2. 研究の目的

近年、各 microRNA がヒト疾患に果たす役割について研究が進んでいる。我々もこれまで microRNA が様々な皮膚疾患の病態に関わり、診断あるいは病勢マーカーになりうると同時に、治療のターゲットとなる可能性を検討してきた。例えば全身性強皮症・限局性強皮症・好酸球性筋膜炎・硬化性萎縮性苔癬などの皮膚線維化疾患の病変部皮膚では線維芽細胞の活性化とコラーゲン産生亢進が生じていると考えられているがその原因は不明であり、また臨床的に有用な疾患マーカーや根治的な治療薬は存在しない(Jinnin M, J Dermatol 2010)。全身性強皮症の病変部では microRNA の一つである let-7a の発現が低下しており、皮膚線維芽細胞において target であるコラーゲン発現を増加させることで線維化に寄与している(Makino K, et al. J Immunol 2013)。さらに血清 let-7a は疾患の活動性と逆相関し、マウスの腹腔内に let-7a を注射する事で皮膚の線維化を抑制できる事を示した。

マイクロアレイや次世代シーケンサーといった技術革新によって、転写産物の実に 95%以上が non-coding RNA であることが明ら

かになり、量・種類ともに coding RNA を圧倒していることが判明している。non-coding RNA が今後の生命科学の発展の鍵の一つのなりうる中で、我々はその研究に現在検討をすすめている microRNA のみならず lncRNA の研究が不可欠と考えるに至った。例えば昨年、生体内には non-coding RNA の一種として環状 RNA(circRNA)が存在し microRNA を阻害していることが明らかにされた(Memczac S, et al. Nature 2013)が、microRNA と lncRNA が相互作用したり、microRNA が lncRNA の発現を制御している可能性もある。

以上のような経緯から、本研究計画において我々は全身性強皮症を含む皮膚線維化疾患での lncRNA の病態への関与の解明を目指した。

3. 研究の方法

平成 27 年度は皮膚線維化疾患の皮膚組織から lncRNA を抽出し、3 種類の lncRNA を中心に real-time PCR や in situ hybridization で発現量・局在を調べ、siRNA や expression vector で機能解析を行った。

平成 28 年度以降は血清中 lncRNA の発現解析を行い、疾患マーカーとしての有用性を評価した。さらに皮膚線維化マウスモデルにおいて lncRNA を強発現あるいは抑制し、皮膚線維化を改善できるかを調べて治療薬としての有用性を確認した。

4. 研究成果

平成 27 年度は、lncRNA の一つ TSIX が強皮症患者の病変部皮膚で他の疾患や正常皮膚よりも発現が増加しており、さらにその局在は皮膚線維細胞であることを突き止めることができた。また、TSIX siRNA により collagen mRNA の stability が有意に減少した。つまり、TSIX そのものは皮膚線維芽細胞において collagen mRNA の stability を維持することでコラーゲン発現をコントロールするが、強皮症皮膚線維芽細胞では TSIX が増加することでコラーゲン発現が恒常的に増加し、ひいては組織の線維化が誘導されると考えられた。

そして平成 28 年度は、TSIX の血清中濃度の疾患マーカーとしての有用性を評価するため、少数の血清サンプルから RNA を抽出し、TSIX が実際に血清中にも発現していることを real-time PCR で確認することができた。また、多数の強皮症患者群で血清 TSIX 濃度を測定したところ、正常対照群に比較して強皮症患者群で有意に増加していたため診断に有用である可能性が示唆された。さらに患者群において臨床症状との相関を調べたところ、スキンスコアとの相関を認め、病勢マ

ーカーとしての有用性も示唆された。

また派生する研究として、悪性黒色腫患者の血清中 snoRNA host gene 5 濃度が全く新しい腫瘍マーカーになる可能性についても報告した。

・平成 29 年度は震災や異動により研究が遅延したが、in vivo での TSIX をターゲットとした治療の効果を調べるため、皮膚線維化モデルマウスにおいて TSIX を阻害して、生じる変化を観察することで治療応用の可能性を明らかにした。過去の microRNA の投与実験に準じて (Makino K, et al. J Immunol 2013)、TSIX siRNA を週に一度腹腔内注射し、ブレオマイシン 28 日間連続局注による皮膚の線維化を抑制出来るかを評価した。その結果、TSIX siRNA はブレオマイシンによる皮膚真皮厚の増加を有意に抑制した。また、TSIX siRNA はコラーゲン mRNA の発現を抑制していたことより、抗線維化作用は想定された機序によると考えられた。

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 18 件)

1, Sawamura S, Jinnin M*, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Ichihara A, Makino T, Fukushima S, Ihn H. Do scleroderma patients look young?: Evaluation by using facial imaging system. Drug Discov Ther. 2017; 11: 342-5.

2, Jinnin M, Yamamoto T, Asano Y, Ishikawa O, Sato S, Takehara K, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of eosinophilic fasciitis. J Dermatol. 2017 in press

3, Oka A, Asano Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Kuwana M, Kawaguchi Y, Yamamoto T, Takahashi H, Goto D, Endo H, Jinnin M, Mano S, Hosomichi K, Mabuchi T, Ueda MT, Nakagawa S, Beck S, Bahram S, Takehara K, Sato S, Ihn H. RXRB is an MHC-encoded susceptibility gene associated with anti-Topoisomerase I antibody-positive systemic sclerosis. J Invest Dermatol. 2017; 137: 1878-86.

4, Ide M, Jinnin M*, Tomizawa Y, Wang Z, Kajihara I, Fukushima S, Hashizume Y, Asano Y, Ihn H. Transforming growth factor β -inhibitor Repsox downregulates collagen expression of scleroderma dermal fibroblasts and prevents bleomycin-induced mice skin

fibrosis. Exp Dermatol. 2017; 26: 1139-43.

5, Sawamura S, Jinnin M*, Shimbara M, Nakamura K, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H. Serum levels of genomic DNA of $\alpha 1(I)$ collagen are elevated in scleroderma patients. J Dermatol. 2017; 44: 927-31.

6, Terao C, Kawaguchi T, Dieude P, Varga J, Kuwana M, Hudson M, Kawaguchi Y, Matucci-Cerinic M, Ohmura \square K, Riemekasten G, Kawasaki A, Airo P, Horita T, Oka A, Hachulla E, Yoshifuji H, Caramaschi P, Hunzelmann N, Baron M, Atsumi T, Hassoun P, Torii T, Takahashi M, Tabara Y, Shimizu M, Tochimoto A, Ayuzawa N, Yanagida H, Furukawa H, Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Yamamoto T, Goto D, Asano Y, Jinnin M, Endo H, Takahashi H, Takehara K, Sato S, Ihn H, Raychaudhuri S, Liao K, Gregersen P, Tsuchiya N, Riccieri V, Melchers I, Valentini G, Cauvet A, Martinez M, Mimori T, Matsuda F, Allanore Y. Transethnic meta-analysis identifies GSDMA and PRDM1 as susceptibility genes to systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2017; 76:1150-8.

7, Nakayama W, Jinnin M*, Tomizawa Y, Nakamura K, Kudo H, Inoue K, Makino K, Honda N, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H. \square Dysregulated interleukin-23 signalling contributes to the increased collagen production in scleroderma fibroblasts via balancing microRNA expression. Rheumatology (Oxford). 2017; 56: 145-55.

8, Wang Z, Nakamura K, Jinnin M*, Kudo H, Goto M, Era T, Kira T, Nakashima T, Fukushima S, Ihn H. Establishment and gene expression analysis of disease-derived induced pluripotent stem cells of scleroderma. J Dermatol Sci. 2016; 84: 186-96.

9, Nakamura K, Jinnin M*, Harada M, Kudo H, Nakayama W, Inoue K, Ogata A, Kajihara I, Fukushima S, Ihn H. Altered expression of CD63 and exosomes in scleroderma dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2016; 84: 30-9.

10, Jinnin M*. A possible mechanism of hypercoagulation status in scleroderma. Br J Dermatol. 2016; 174: 263.

11, Makino T, Jinnin M*. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. J Dermatol. 2016; 43: 10-8.

12, Nakamura K, Jinnin M*, Kudo H, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Kajihara I, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H. The role of PSMB9 upregulated by interferon signature in the pathophysiology of cutaneous lesions of dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. Br J Dermatol. 2016; 174: 1030-41.

13, Wang Z, Jinnin M*, Nakamura K, Harada M, Kudo H, Nakayama W, Inoue K, Nakashima T, Honda N, Fukushima S, Ihn H. Long non-coding RNA TSIX is upregulated in scleroderma dermal fibroblasts and controls collagen mRNA stabilization. Exp Dermatol. 2016; 25: 131-6.

14, Inoue M, Jinnin M*, Wang Z, Nakamura K, Inoue K, Ichihara A, Moriya C, Sakai K, Fukushima S, Ihn H. 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; 55: 786-90.

15, Ichigozaki Y, Fukushima S, Jinnin M, Miyashita A, Nakahara S, Tokuzumi A, Yamashita J, Kajihara I, Aoi J, Masuguchi S, Zhongzhi W, Ihn H. Serum long non-coding RNA, snoRNA host gene 5 level as a new tumor marker of malignant melanoma. Exp Dermatol. 2016; 25: 67-9.

16, 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. EBI3 downregulation contributes to type I collagen overexpression in scleroderma skin. J Immunol 2015; 195: 3565-73.

17, 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.

18, Jinnin M*. Recent progress in studies of miRNA and skin diseases. J Dermatol 2015; 42: 551-8.

〔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

神人正寿 (JINNIN MASATOSHI)
和歌山県立医科大学 皮膚科・教授
研究者番号：60401048

(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

()