

令和元年6月3日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09799

研究課題名(和文)自己免疫性水疱症における炎症性老化と免疫老化による自己免疫発症機序の解明

研究課題名(英文) Aging and chronic inflammation involved in the immune tolerance dysfunction of autoimmune bullous diseases

研究代表者

古村 南夫 (Furumura, Minao)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：10315070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性水疱症において、慢性炎症と老化が発症へどのように関与しているかを解明するために、血清由来のエクソソーム包含マイクロRNA(miRNA)の発現パターンを解析した。血清中の成熟型miRNAを選択的にラベルし、ハイブリダイゼーションしたあとに、miRNAマイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。多くのmiRNAの発現量の有意な上昇あるいは低下を認め、自己免疫性水疱症患者血清において、特異的に発現が変化しているmiRNAが見出された。慢性炎症と老化との関連が報告されているものもあり、自己免疫性水疱症の新規バイオマーカーとしての可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自己免疫性水疱症における慢性炎症と免疫老化の自己免疫発症への関与を、血清由来のエクソソーム包含マイクロRNA(miRNA)の発現パターン解析を通じて解明することを目的とする。血清miRNAには、加齢や自己免疫性・炎症性疾患で発現が変化するものも知られており、自己免疫性水疱症患者において特異的に変化するmiRNA発現情報がバイオマーカーとして活用できれば、発症機序や免疫寛容破綻の解明にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate how chronic inflammation and aging are involved in the onset of autoimmune bullous disease, we analyzed the expression patterns of serum-derived exosome-containing microRNAs(miRNAs). After selective labeling and hybridization of mature miRNAs in serum, a comprehensive analysis was performed using miRNA microarrays. A number of significantly up- or down-regulated miRNAs were found, including specific expression-altered miRNAs in autoimmune bullous diseases. These findings have indicated that miRNAs could be a novel biomarker for autoimmune bullous disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫 水疱症 老化 エクソソーム バイオマーカー マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫性水疱症は、免疫寛容破綻と自己抗体による組織傷害によって惹起される。免疫寛容破綻の原因のひとつとして老化があるが、特に水疱性類天疱瘡群は、中高年で高頻度の発症が知られており、老化と慢性炎症に基づいた発症病態が考えられる。

エクソソームは、細胞外小胞 (30 ~ 150nm) として、mRNA や miRNA などの核酸やタンパク質を内包し、体内での到達先において様々な内包する情報を伝えて細胞機能 (遺伝子発現など) を調節する。細胞間情報伝達の担い手であるため、診断・治療への活用が期待される。

miRNA は細胞内のみならず、血清にも多くの種類が存在し、個々の発現量が様々な疾患のバイオマーカーとなる可能性が示唆されている。

近年、血清から抽出したエクソソームを解析することにより、血清中の mtDNA や miRNA の発現を分析することが可能になった。mtDNA をバイオマーカーとして慢性炎症を検出できることが明らかになった。炎症性老化を引き起こす免疫老化の分子病態に、miRNA など、エピジェネティックな制御機構が関与することが明らかにされた。

免疫異常での遠隔作用などに関与するエクソソームでは mtDNA だけでなく、このような不安定な miRNA も安定化されるため、miRNA を保存血清から容易に抽出し解析できる。血清から抽出された miRNA 解析は新たなバイオマーカー探索にも利用できる可能性がある。

#### 2. 研究の目的

本研究では、自己免疫性水疱症における慢性炎症と老化の発症への関与を、血清由来のエクソソーム包含マイクロ RNA (miRNA) の発現パターン解析を通じて解明することを目的とする。

血清エクソソーム miRNA の一部には、加齢や自己免疫性疾患で増加するものが知られており、miRNA 発現パターンと関連遺伝子情報の分析は、発症に関わる自己免疫寛容破綻などの解明にも役立つと考えられる。

#### 3. 研究の方法

血清よりトータル RNA を抽出し、成熟型 miRNA の選択的なラベル化とハイブリダイゼーションを行い、miRNA マイクロアレイにより miRNA 発現量の網羅的解析を行った。

miRNA の発現解析には SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイキット 8 × 60 k (Human\_miRNA\_V21.0) (Agilent Technologies) を使用した。血清 200 μl から、miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit を用いて抽出した total RNA (100 ng) を miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent 社) を用いて、プロトコール (Agilent miRNA system Version 3.1.1) に従い Cyanine3-pCp を 3' 末端に付加することによって成熟型 miRNA を選択的にラベリングした。ラベル化 RNA は 55 °C でマイクロアレイに 20 時間ハイブリダイゼーションした後、DNA microarray scanner (Agilent Technologies) にてシグナルを検出した。

検出したシグナルは Agilent feature extraction software (v9.5.3.1) によるデータの数値化後、GeneSpring software にて annotation を行った。健常者コントロールや対照疾患群との比較にて 2 倍以上の増加もしくは 0.5 倍以下に低下した miRNA をバイオマーカー候補とした。

#### 4. 研究成果

水疱性類天疱瘡において複数の miRNA の発現量の有意な上昇あるいは低下を認め、年齢層別の比較や尋常性天疱瘡との比較でも発現パターンに類似性や相違が認められるものがあった。

老化と慢性炎症に関わる可能性のある miRNA が複数確認され、新規バイオマーカーとしての可能性が考えられた。

水疱症の症例血清での有意な減少が確認できたものとして、SLE 症例の血清や SLE のモデル

マウス胸腺，脾臓でも増加している miR-451，SLE 症例で増加している miR-223，細胞・臓器モデルの多くで老化に伴い発現低下するとされる miR-19b，早老症やヒストン脱アセチル化酵素の発現に関連する miR-16 が同定できた。他方，有意な増加が認められたものとして，変形性関節症や川崎病で増加する miR-671 が確認できた。

今後，得られた miRNA 発現パターンと関連遺伝子情報の分析が，発症に関わる自己免疫寛容破綻などの解明にも役立つと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Koga H, Teye K, Ishii N, Ohata C, Nakama T. High Index Values of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for BP180 at Baseline Predict Relapse in Patients With Bullous Pemphigoid. *Front Med (Lausanne)*. 5:139, 2018. doi: 10.3389/fmed.2018.00139. 査読有。
2. Ohata C, Ohyama B, Nagata H, Furumura M, Nakama T. Reply to: Direct Immunofluorescence Findings in Discoid Lupus Erythematosus and Bullous Pemphigoid. *Am J Dermatopathol*. 39:321-322, 2017. 査読有。
3. Yasuda H, Kanazawa N, Matsuda M, Hamada T, Furumura M, Hashimoto T, Nakama T, Furukawa F. *Ann Dermatol*. 29:642-644, 2017. 査読有。
4. Nishikawa R, Takahashi H, Matsuda M, Imaoka K, Ogawa M, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Komorowski L, Probst C, Hachiya T, Fritzler MJ, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Krol RP, Muro Y, Morita E, Hashimoto T. Anti-early endosome antigen 1 autoantibodies were detected in a pemphigus-like patient but not in the majority of pemphigus diseases. *Exp Dermatol*. 25 : 369-371, 2016. 査読有。
5. Hayakawa T, Teye K, Hachiya T, Uehara R, Hashiguchi M, Kawakami T, Li X, Tsuchisaka A, Ohara K, Sogame R, Koga H, Hamada T, Ohata C, Furumura M, Ishii N, Fukano H, Shimozato K, Hashimoto T. Clinical and immunological profiles of anti-BP230-type bullous pemphigoid: Restriction of epitopes to the C-terminal domain of BP230, shown by novel ELISAs of BP230-domain specific recombinant proteins. *Eur J Dermatol*. 26:155-163, 2016. 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)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石井 文人

ローマ字氏名：ISHII norito

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80330827

研究分担者氏名：大山 文吾

ローマ字氏名：OHYAMA bungo

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 90461441

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。