

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08307

研究課題名(和文)皮膚線維化疾患特異的環状RNAの発現・機能解析

研究課題名(英文)circular RNA in fibrotic skin disease

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：強皮症皮膚由来の培養線維芽細胞を用いてアレイを行なったところ、50以上のリードを有し taqman システムで検出できる環状RNAとして、ある環状RNA(X)に注目した。正常線維芽細胞において環状RNA(X)をレンチウイルスを用いて強制発現させたところ、I型コラーゲンやCTGFの蛋白発現が抑制された。また、血清からRNAを抽出し、環状RNA(X)が実際に血清中にも発現しているかを少数のサンプルを用いて real-time PCR にて確認を試みたが、増幅はみられず、我々の実験系では血清中の環状RNAの検出はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画の意義としては病態の解明のみならず、皮膚組織で特異的環状RNAを検出する事で各疾患の診断や病勢の評価ができれば、より鋭敏な全く新しい疾患マーカーの開発につながる創造性が存在する。さらに、マウスモデルを用いて環状RNAを特異的に補充あるいは阻害する事で皮膚線維化が抑制出来ることを証明出来れば、新規治療の開発につながる。社会へ与えるインパクトとして、膠原病の病態解明・診断・治療法の開発は医学全体における長年の課題であった。膠原病を含むいわゆる難病の原因解明は国民の健康増進に大きく寄与するとともに難病に対する社会の考え方を大きく変えることができる。

研究成果の概要(英文)：We performed array analysis using cultured fibroblasts derived from scleroderma skin, and focused on a cyclic RNA (X) as a circular RNA that has more than 50 reads and can be detected by the taqman system. When the circular RNA(X) was forcibly expressed in normal fibroblasts using a lentivirus, the protein expression of type I collagen and CTGF was suppressed. In addition, we extracted RNA from serum and tried to confirm whether the circular RNA(X) was actually expressed in serum by real-time PCR using a small number of samples, but there was no amplification and we could not detect the RNA in serum in our experimental system.

研究分野：皮膚科学

キーワード：強皮症

1. 研究開始当初の背景

近年のめざましい医学の進歩にも関わらずその原因が判明していない疾患がまだまだ存在し、その代表的なものとして膠原病があげられる。膠原病はその名の通り膠原線維(コラーゲン)に異常をきたす疾患の総称であり、その一つが全身性強皮症である。全身性強皮症は皮膚および肺など多臓器に線維化を生じる系統的疾患であるが、線維化の原因としてのコラーゲン異常発現の機序は未だ不明であり、線維化は一般に不可逆的であるため早期診断が必要だが有用な血液マーカーは同定されておらず、また有効な治療法にも乏しい。

膠原病には一般に遺伝素因と環境素因が発症に関与すると考えられているが、研究代表者らはその環境因子として non-coding RNA に注目してきた。ヒトの細胞には蛋白質をコードしていない non-coding RNA が存在しこれまで「ゴミ」と思われてきたが、実は DNA(遺伝素因)を後天的に修飾することで環境因子として DNA-mRNA-蛋白発現をオン/オフする機構であるエピジェネティクスに関わる。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、前者の代表が平均 22 塩基程度の microRNA であり、様々な mRNA の 3' UTR の相補的配列に結合し翻訳を阻害する事で蛋白発現調節をしている。ヒトゲノムには 2,000 種類以上の microRNA が存在することが分かっており、microRNA 関連の研究論文は現在 Pubmed 上で約 7 万編と急速に増加している。また、H29 年 7 月に国立がん研究センターが血液 1 滴に含まれる microRNA から 13 種類の癌を早期発見する新しい検査法を開発したことがプレスリリースされ注目された。研究代表者らも microRNA と皮膚疾患に関してこれまで 45 編の研究論文を発表している。

一方、non-coding RNA の一種として環状 RNA が動物細胞で見いだされている。長らくその働きは明らかになっていなかったが、環状 RNA の一つである ciRS-7 には microRNA の一つ miR-7 結合部位が多数存在し、多数の microRNA を結合し阻害する「スポンジ」として機能していることが判明し近年注目を集めている(Memczac S, et al. Nature 2013)。これらの研究は、環状 RNA もまた遺伝子-蛋白の発現調節に関連する機能を有し環境因子となりうることを示唆している。しかし、ヒト疾患での役割は完全には解明されておらず、皮膚疾患や膠原病ではほとんど検討もされていない。

2. 研究の目的

以上のような経緯から、本研究計画において研究代表者らは全身性強皮症・限局性強皮症・好酸球性筋膜炎・硬化性萎縮性苔癬を含む皮膚線維化疾患での環状 RNA の病態への関与の解明を目的とした。具体的には、環状 RNA の全身性強皮症を含む皮膚線維化疾患の病変分における発現異常の有無、血清中濃度の疾患マーカーとしての有用性、そして線維化モデルマウスにおける環状 RNA による治療効果を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

環状 RNA の発現解析のため、total RNA を抽出し、DNase I および RNase R (Epicentre) で処理して linear RNA を分解し環状 RNA を濃縮した。PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio) を用いて cDNA 化し、得られた cDNA を鋳型として Takara Thermal Cycler Dice (TP800) 上で Quantitative real-time PCR を行った。PCR には Premix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara) を用いた TaqMan systems を用いた。データの解析は Thermal Cycler Dice Real Time System ver2.10B ソフトウェア (Takara) 上で行った。各サンプルの環状 RNA の発現量は、対応する (通常の転写を受けた) linear RNA の発現量および house keeping 遺伝子である EEF1A1 濃度によって補正し、過去の報告通り環状 RNA/linear RNA 比および相対環状 RNA 発現量の 2 つを評価した。

環状 RNA の発現の局在評価には、特異的プローブと病変部皮膚組織での in situ hybridization を用いた。環状 RNA の強制発現あるいは強制抑制には siRNA あるいは CRISPR/Cas9、レンチウィルスを用いた。

4. 研究成果

最初に、全身性強皮症やその他の皮膚線維化疾患の皮膚組織から RNA を抽出し、過去にヒトで報告数が多い環状 RNA の中から、皮膚線維化疾患の病変部皮膚で特異的に発現変化しているものを real-time PCR を用いての同定を試みたが、正常皮膚との間に有意差を得ることができなかった。そこで、研究計画調書「研究が当初計画どおりに進まない時の対応」に記載した通り、強皮症皮膚由来の培養線維芽細胞を用いてアレイを行なった。アレイの結果、正常線維芽細胞に比べて強皮症線維芽細胞で発現が変化しているもののうち、50 以上のリードを有し taqman システムで検出できる環状 RNA として、ある環状 RNA (X) に注目した。環状 RNA (X) は強皮症線維芽細胞においてアレイで増加しており、real-time PCR でもその発現と環状 RNA/linear RNA 比が増加していることが確認された。一方、正常線維芽細胞において環状 RNA (X) をレンチウィルスを用いて強制発現させたところ、I 型コラーゲンや CTGF の蛋白発現が抑制された。mRNA 発現は変化しなかったため post-transcriptional な変化と思われた。また、強発現により細胞数も減少するため、強皮症線維芽細胞において functional な環状 RNA である可能性が示唆された。

次に、機能的環状 RNA (X) の「血清中濃度の疾患マーカーとしての有用性」の評価を試みた。環状 RNA は RNase の分解を受けにくいいため、血液中でもその存在が確認されている (Memczaki S, et al. PLoS One 2015)。mirVana PARIS (Ambion) を用いて血清から RNA を抽出し、目的とする複数の環状 RNA が実際に血清中にも発現しているかを少数のサンプルを用いて real-time PCR にて確認を試みたが、増幅はみられず、我々の実験系では血清中の環状 RNA の検出はできなかった。よって我々の目的とする皮膚線維化関連環状 RNA は組織中で機能性を有する可能性はあるが、一方で血液中のバイオマーカーとしての有用性は低い可能性があることを確認できたと考える。これは、他の non-coding RNA に比べて血清中の環状 RNA の解析を行った論文が比較的少ないことに合致する結果である。

その後、線維化モデルマウスでの in vivo における線維化関連作用の検討のために環状 RNA (X) の siRNA の作成を試みており、よりよい発現抑制効率を

有する siRNA 配列を比較検討している。

これらの研究によって得た成果は、Nakashima S, et al. *Intractable Rare Dis Res* 2019 と、Shimada S et al., *J Dermatol Sci* 2020 の2つの論文として発表することができた。さらに現在、もう一編の環状 RNA(X)に関する研究論文の作成を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tabata Kayoko, Mikita Naoya, Yasutake Misaki, Matsumiya Ryo, Tanaka Katsunori, Tani Sayaka, Okuhira Hisako, Jinnin Masatoshi, Fujii Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 Up-regulation of IGF-1, RANTES and VEGF in patients with anti-centromere antibody-positive early/mild systemic sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2020.1726599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jinnin Masatoshi, Ohta Akiko, Ishihara Shoichiro, et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 First external validation of sensitivity and specificity of the European League Against Rheumatism (EULAR)/American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for idiopathic inflammatory myopathies with a Japanese cohort	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 387~392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2019-215488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Satoko, Jinnin Masatoshi, Ide Maho, Kajihara Ikko, Igata Toshikatsu, Harada Miho, Masuguchi Shinichi, Fukushima Satoshi, Masuzawa Mikio, Masuzawa Mamiko, Amoh Yasuyuki, Ihn Hironobu	4. 巻 8
2. 論文標題 A potential significance of circ_0024169 down regulation in angiosarcoma tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 129~133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/iridr.2019.01034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hara Tomoyuki, Ikeda Takaharu, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Mikita Naoya, Kaminaka Chikako, Kanazawa Nobuo, Yamamoto Yuki, Tabata Kayoko, Fujii Takao, Jinnin Masatoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Peripheral blood eosinophilia is associated with the presence of skin ulcers in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 334~337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14774	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Tomoyuki, Ikeda Takaharu, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Mikita Naoya, Kaminaka Chikako, Kanazawa Nobuo, Yamamoto Yuki, Tabata Kayoko, Fujii Takao, Jinnin Masatoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Peripheral blood eosinophilia is associated with the presence of skin ulcers in patients with systemic sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 334-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohsaka Hitoshi, Mimori Tsuneyo, Kanda Takashi, Shimizu Jun, Sunada Yoshihide, Fujimoto Manabu, Kawaguchi Yasushi, Jinnin Masatoshi, Muro Yoshinao, Ishihara Shoichiro, Tomimitsu Hiroyuki, Ohta Akiko, Sumida Takayuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Treatment consensus for management of polymyositis and dermatomyositis among rheumatologists, neurologists and dermatologists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1521185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohsaka Hitoshi, Mimori Tsuneyo, Kanda Takashi, Shimizu Jun, Sunada Yoshihide, Fujimoto Manabu, Kawaguchi Yasushi, Jinnin Masatoshi, Muro Yoshinao, Ishihara Shoichiro, Tomimitsu Hiroyuki, Ohta Akiko, Sumida Takayuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Treatment consensus for management of polymyositis and dermatomyositis among rheumatologists, neurologists and dermatologists	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e1-e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano Yoshihide, Fujimoto Manabu, Ishikawa Osamu, Sato Shinichi, Jinnin Masatoshi, Takehara Kazuhiko, Hasegawa Minoru, Yamamoto Toshiyuki, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of localized scleroderma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 755-780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano Yoshihide, Jinnin Masatoshi, Kawaguchi Yasushi, Kuwana Masataka, Goto Daisuke, Sato Shinichi, Takehara Kazuhiko, Hatano Masaru, Fujimoto Manabu, Mugii Naoki, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of systemic sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 633-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okiyama Naoko, Asano Yoshihide, Hamaguchi Yasuhiro, Jinnin Masatoshi, Motegi Sei-ichiro, Koizumi Haruka, Hasegawa Minoru, Ishikawa Osamu, Sato Shinichi, Takehara Kazuhiko, Yamamoto Toshiyuki, Fujimoto Manabu, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Impact of a new simplified disability scoring system for adult patients with localized scleroderma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 431-435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawamura Soichiro, Jinnin Masatoshi, Inoue Kuniko, Yamane Keitaro, Honda Noritoshi, Kajihara Ikko, Makino Takamitsu, Masuguchi Shinichi, Fukushima Satoshi, Ihn Hironobu	4. 巻 90
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of collagen expression by interleukin-22 signaling in scleroderma fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2017.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kochi Y, Kamatani Y, Kondo Y, Suzuki A, Kawakami E, Hiwa R, Momozawa Y, Fujimoto M, Jinnin M, et al.	4. 巻 77
2. 論文標題 Splicing variant of WDFY4 augments MDA5 signalling and the risk of clinically amyopathic dermatomyositis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 602-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2017-212149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Minoru, Ishikawa Osamu, Asano Yoshihide, Sato Shinichi, Jinnin Masatoshi, Takehara Kazuhiko, Fujimoto Manabu, Yamamoto Toshiyuki, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of lichen sclerosis et atrophicus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 891-897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinnin Masatoshi, Yamamoto Toshiyuki, Asano Yoshihide, Ishikawa Osamu, Sato Shinichi, Takehara Kazuhiko, Hasegawa Minoru, Fujimoto Manabu, Ihn Hironobu	4. 巻 45
2. 論文標題 Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of eosinophilic fasciitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 881-890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Sayaka, Kaminaka Chikako, Nishiyama Kosuke, Yariyama Azusa, Nakatani Yumi, Inaba Yutaka, Kunimoto Kayo, Yamamoto Yuki, Makino Katsunari, Makino Takamitsu, Jinnin Masatoshi	4. 巻 102
2. 論文標題 yRNA3 up-regulation in cultured dermal fibroblasts and yRNA4 down-regulation in the sera of scleroderma patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 68~71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabata Kayoko, Jinnin Masatoshi, Furukawa Kanako, Tani Sayaka, Okuhira Hisako, Mikita Naoya, Fujii Takao	4. 巻 14
2. 論文標題 Finger sweating levels evaluated by video capillaroscopy system are increased in patients with systemic sclerosis compared to pre-clinical stage patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 325~329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2020.03107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Shuichi, Makino Katsunari, Jinnin Masatoshi, Sawamura Soichiro, Kawano Yuya, Ide Maho, Kajihara Ikko, Makino Takamitsu, Fukushima Satoshi, Ihn Hironobu	4. 巻 100
2. 論文標題 CXCL17-mediated downregulation of type I collagen via MMP1 and miR-29 in skin fibroblasts possibly contributes to the fibrosis in systemic sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 183 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaminaka Chikako, Yamamoto Yuki, Sakata Mariko, Hamamoto Chiaki, Misawa Eriko, Nabeshima Kazumi, Saito Marie, Tanaka Miyuki, Abe Fumiaki, Jinnin Masatoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Effects of low dose Aloe sterol supplementation on skin moisture, collagen score and objective or subjective symptoms: 12 week, double blind, randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 998 ~ 1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Sayaka, Kunimoto Kayo, Inaba Yutaka, Mikita Naoya, Kaminaka Chikako, Kanazawa Nobuo, Yamamoto Yuki, Kakimoto Nobuyuki, Suenaga Tomohiro, Takeuchi Takashi, Suzuki Hiroyuki, Jinnin Masatoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Change of serum cytokine profiles by propranolol treatment in patients with infantile hemangioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 89 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2020.03014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神人正寿
2. 発表標題 全身性強皮症患者における血清コラーゲンDNA量の検討
3. 学会等名 エラスチン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神人
2. 発表標題 強皮症に伴う潰瘍に対するエキソソームの治療応用
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関