

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17776

研究課題名(和文) 全身性強皮症の病態における皮膚微小血管内皮細胞由来microRNAの役割の検討

研究課題名(英文) Role of microRNAs derived from dermal microvascular endothelial cells in the pathogenesis of systemic scleroderma.

研究代表者

牧野 雄成 (Makino, Katsunari)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授

研究者番号：00433037

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)：本研究では、全身性強皮症の皮膚組織から微小血管内皮細胞の培養を行い、細胞内のmicroRNAの発現を健常人と比較し、全身性強皮症の血管障害に關するmicroRNAの解析を目的とした。全身性強皮症の皮膚微小血管内皮細胞では、健常人と比較してmiR-155、miR-221、miR-222のmiRNAの発現が有意に上昇していた。miR-155、miR-221、miR-222を血管内皮細胞で高発現させると、間葉系細胞のマーカーのFSP1、ACTA2が上昇傾向となり、血管内皮細胞マーカーであるvWFは低下傾向となった。これらのmicroRNAは、全身性強皮症の血管障害に關与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は皮膚をはじめ他臓器に線維化を生じる疾患であり、線維化、自己免疫異常、血管障害などの病態が複雑に關与するとされる。血管障害としては、レイノー症状や指潰瘍などの症状が知られているが、血管障害の機序は明らかになっていない。本研究では、血管障害にマイクロRNAの異常が關与しているか検討を行った。全身性強皮症の皮膚から血管内皮細胞を培養し、マイクロRNAの発現を健常人と比較した結果、miR-155、miR-221、miR-222が全身性強皮症で上昇していることを見出した。本研究により、全身性強皮症の血管障害へマイクロRNAの異常が關与する可能性が示唆された。

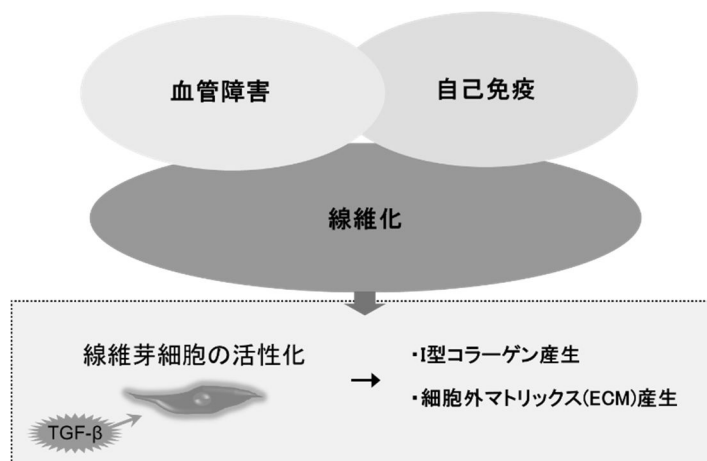
研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is an acquired disorder characterized by the fibrosis of the skin and internal organs. Although the pathogenesis of this disease is still unclear, it includes vascular damage, fibrosis, and auto-immune disorder. In this study, we compared the microRNA expression profile in cultured dermal microvascular endothelial cells (ECs) of SSc with that of healthy control. Upon comparison of the expression of microRNA between SSc and healthy control EC, miR-155, miR-221 and miR-222 were found to be significantly upregulated in SSc EC. The overexpression of miR-155, miR-221 or miR-222 in human dermal EC led to the induction of mesenchymal cell markers FSP1 and ACTA2, whereas led to the reduction of endothelial cell markers vWF. Also, we found the overexpression of miR-221 blocked the endothelial cell tube formation. Our data indicate that understanding miRNA signaling of endothelial cells may lead to a therapeutic approach for SSc.

研究分野：皮膚科学、リウマチ病学

キーワード：全身性強皮症 皮膚血管内皮細胞 microRNA

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚の硬化(線維化)を主症状とし、皮膚だけでなく心臓、肺、腎臓、消化管など多臓器にも線維化を生じうる疾患である。血管障害、自己免疫異常、代謝異常などが相互に関連して病態が形成されると考えられているが病因ははまだ明らかになっていない。全身性強皮症の硬化皮膚では、活性化した線維芽細胞によるⅠ型コラーゲンなどの過剰な細胞外マトリックス産生が線維化の主要因と考えられている(Allanore Y et al. Nat Rev Dis Primers 2015)。全身性強皮症の皮膚線維芽細胞が過剰なⅠ型コラーゲンを産生する機序として、線維芽細胞においてⅠ型コラーゲン産生を強力に誘導する transforming growth factor β (TGF- β)が重要とされ、実際全身性強皮症の硬化部位では TGF- β シグナルが亢進しているとの報告が多くなされている(Lafyatis R. Nat Rev Rheumatol. 2014)。



線維芽細胞の活性化に重要な TGF- β の産生源については、何らかの異常を受けた血管内皮細胞や、血管内皮細胞の障害により遊走してきたマクロファージなどの炎症細胞から産生されると報告されてきた。よって全身性強皮症の病態における血管障害は、硬化病態を形成する初期異常であることが推測される。実際、寒冷暴露による血管攣縮によって指先が蒼白となるレイノー現象という臨床症状は、全身性強皮症の初発症状として高頻度にみられる。本研究ではこうした背景から血管異常、特に血管内皮細胞の異常に着目した。

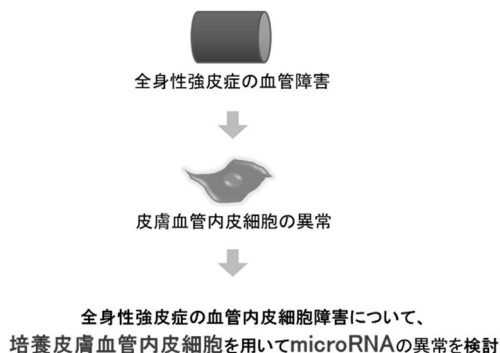
TGF- β の重要性から、これまでに抗 TGF- β 抗体などによる TGF- β シグナルを抑制する治療への試みがなされたが、著明な臨床効果を示してはいない。本研究では、TGF- β 以外に血管内皮細胞から線維芽細胞へ皮膚硬化に関与する情報伝達として microRNA が関与しているのではないかと仮説を立てた。microRNA とは蛋白をコードしていない non coding RNA の一種である。microRNA は配列特異的に遺伝子発現を抑制する機構である RNA 干渉に関与し、ヒトでは 3,000 種類以上の microRNA の存在が推測されている。microRNA は標的 mRNA の主に 3' 非翻訳領域に結合し、蛋白への翻訳抑制へ寄与するとされる。蛋白をコードしていない小さな RNA であるが、microRNA は mRNA の翻訳阻害などを介して細胞増殖や分化、発生など多くの生物学的機構に関与していることが明らかにされている。実際、microRNA let-7a などが全身性強皮症の皮膚硬化へ関与することが報告されている(Makino K et al. J Immunol 2013)。

血管内皮細胞における microRNA の異常が周囲にどのように伝達されるのかについては、エクソソームの関与も推測された。エクソソームとは直径が 100nm 程の脂質二重膜小胞であり、その内部には microRNA、mRNA、タンパク質などが存在している。エクソソームは細胞外小胞(extracellular vesicles)の一種であり、細胞外へ放出されたエクソソームは、内部の microRNA などを他の細胞に伝達することで、様々な情報伝達に関与している。全身性強皮症において重要な病態と考えられる血管障害には、血管内皮細胞が関与していると予想される。そのため血管内皮細胞から放出されるエクソソーム内に含まれる microRNA は、血管内皮細胞の異常を伝えるキャリアとして重要と推測された。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、本研究では全身性強皮症の血管内皮細胞における microRNA の発現異常

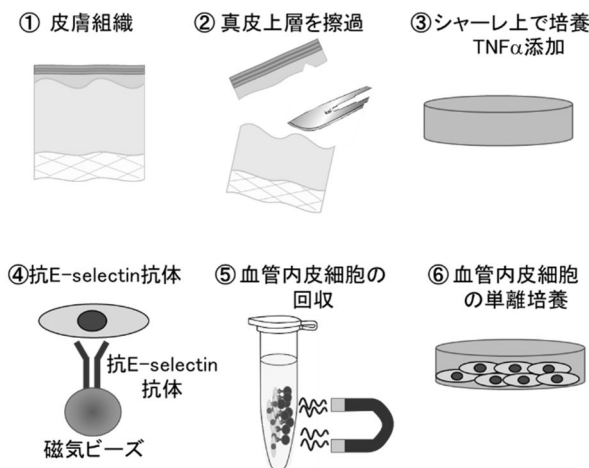
が、血管障害に及ぼす影響を検討することを主目的とした。また、microRNA の異常を伝播するキャリアとしてエクソソームの関与について検討した。



3. 研究の方法

1) 皮膚組織からの皮膚微小血管内皮細胞の採取

皮膚組織は全身性強皮症患者の皮膚硬化を伴った前腕皮膚より取得、全身性強皮症の対照とした皮膚組織は全身性強皮症患者群と年齢、性別に近い健常人より取得した。皮膚組織採取にあたってはヘルシンキ宣言の精神を尊重し、熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会より承諾された文書にて説明し同意、署名を得て行った。全身性強皮症ならびに健常人の皮膚組織を、酵素処理により表皮と真皮に分離させた。真皮上層をメスにて擦過して得られた細胞をシャーレ上で培養した。様々な細胞が混在するシャーレ上の培養細胞へ TNF α 刺激を行ったのち、血管内皮細胞マーカーである E-selectin を結合させた磁気ビーズを用いて血管内皮細胞を回収して分離培養を行った。培養細胞から RNA を回収し、microRNA assay にて miRNA の網羅的な発現解析を行った。



2) 蛍光免疫染色

スライドチャンバー上の培養細胞を 4% paraformaldehyde で固定、ブロッッキングの後、一次抗体 (抗体 CD31 抗体) を反応させ、蛍光色素で標識した二次抗体を用いて蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

3) 血管内皮細胞における遺伝子発現の比較

培養血管内皮細胞に miRNA の mimic 試薬を反応させた後、細胞から RNA を回収、cDNA 化したのち、リアルタイム PCR 法を用いて各種遺伝子の発現の相対定量を行った。標的として同定した microRNA を合成して皮膚微小血管内皮細胞や皮膚培養線維芽細胞へ導入することで microRNA 発現を上昇、また siRNA や microRNA の inhibitor により microRNA の発現を抑制する。その結果として、線維芽細胞における細胞外マトリックス発現などの変化や、血管内皮細胞自身に内皮細胞間葉細胞分化などの線維化に関与する細胞機能の変化がみられるか検討を行った。

4) 血管新生アッセイ

培養血管内皮細胞に miRNA の mimic 試薬を 48 時間反応させた後、matrigel 上で 5 時間細胞培養を行い、生じた血管様の構造を顕微鏡で観察した。

5)皮膚微小血管内皮細胞由来のエクソソーム内 microRNA 解析

皮膚微小血管内皮細胞から培養上清を回収し、エクソソーム膜に存在するホスファチジルセリン (PS) に結合する TIM4 タンパク質が結合された磁気ビーズを利用してエクソソームを回収する。このエクソソームから microRNA を回収し、real-timePCR 法を用いてエクソソームに存在する microRNA の発現解析を行う。

4 . 研究成果

1) 全身性強皮症ならびに健常人皮膚組織からの皮膚微小血管内皮細胞の培養

全身性強皮症と健常人の皮膚血管内皮細胞内における miRNA の発現を比較するため、皮膚生検等により採取した皮膚組織から、真皮上層の血管内皮細胞の培養を行った。この手法を用いて培養した細胞は、血管内皮細胞に特徴的な細胞形態を有しており、また血管内皮細胞マーカーである CD31 を発現していることから、血管内皮細胞であると推定された。次に全身性強皮症と健常人由来の皮膚血管内皮細胞の形態を比較した。いずれも CD31 などの血管内皮細胞のマーカーの発現は確認されたが、全身性強皮症由来の血管内皮細胞は、培養していくうちに紡錘形に変化する細胞の割合が多い印象であった。血管内皮細胞内の miRNA の発現を網羅的に解析するため、全身性強皮症と健常人由来の血管内皮細胞から total RNA を回収し、microRNA assay (3D-Gene® miRNA Oligo chip)にて miRNA の発現解析を行った。その結果、全身性強皮症の皮膚血管内皮細胞では、miR-155、miR-221、miR-222 の3つの miRNA の発現が有意に上昇していた。

2) miR-155、miR-221、miR-222 の mimic 投与による培養皮膚血管内皮細胞内の遺伝子変化

全身性強皮症の皮膚血管内皮細胞において上昇を認めた、miR-155、miR-221、miR-222 の3種類の miRNA について、血管障害に関与するか検討するため、HDMEC を用いて機能解析を行った。HDMEC において miR-155、miR-221、miR-222 を強制発現させて、全身性強皮症の血管内皮細胞内での変化を再現するため、miRNA を人工的に合成した mimic 試薬を HDMEC ヘトランスフェクションさせた。HDMEC において、miR-155、miR-221、miR-222 それぞれの mimic 試薬を導入し、24 時間に RNA を回収した後、mRNA の real-time PCR を行った。FSP1、ACTA2 遺伝子は線維芽細胞など間葉系細胞のマーカーであるが、miR-155、miR-221、miR-222 を HDMEC へ導入すると、これらの間葉系マーカーは上昇傾向であった。また逆に、血管内皮細胞マーカーである vWF は、miR-155、miR-221、miR-222 の mimic 投与後に低下傾向であった。以上の結果からは、血管内皮細胞において miR-155、miR-221、miR-222 が上昇すると、血管内皮細胞の形質が、線維芽細胞などの間葉系細胞へと一部移行していく可能性が示唆された。

3) miR-221 の mimic 投与による培養皮膚血管内皮細胞の血管新生への影響

次に、miR-155、miR-221、miR-222 が、HDMEC の血管新生へ影響を与えるか検討を行うために、mimic 投与後に血管新生アッセイを行った。コントロールでは血管内皮細胞による血管様構造がみられたが、miR-221 を投与すると、血管構造がうまく形成されなかった。miR-155、miR-222 についてはコントロールとの差は明らかではなかった。

4)皮膚微小血管内皮細胞由来のエクソソーム内 microRNA 解析

皮膚微小血管内皮細胞から培養上清を回収し、エクソソーム膜に存在するホスファチジルセリン (PS) に結合する TIM4 タンパク質が結合された磁気ビーズを利用してエクソソームを回収した。エクソソームが回収できていることは、NanoSight を用いた粒子解析で確認している。現在エクソソーム内の microRNA の発現について、real-timePCR 法で検出するための条件設定を行っている。

本研究では、全身性強皮症の培養皮膚微小血管内皮細胞において miR-155、miR-221、miR-222 の3つの miRNA が上昇していることを見出した。これらの miRNA を培養血管内皮細胞へ導入すると間葉系マーカーの発現上昇や、血管新生の障害が生じることから、これらの miRNA の発現異常は、全身性強皮症の血管障害に関与している可能性が示唆された。今回同定した miR-155、miR-221、miR-222 は血管障害への関与が過去に報告されている。miR-155 については、血管内皮の障害や動脈硬化症への関与が報告されており、また miR-221/miR-222 の高発現が血管新生や血管内皮細胞の増殖を抑制するという報告がある。本研究においても、miR-221 は血管内皮細胞の血管新生を阻害していた。全身性強皮症の硬化皮膚において、過剰な Ⅲ型コラーゲンを産生する線維芽細胞の由来の一つとして、血管内皮細胞による endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) が報告されている。miR-155、miR-221、miR-222 の血管内皮細胞の投与により、内皮細胞マーカーの vWF が低下傾向となり、FSP1 や ACTA2 といった間葉系マーカーの発現が上昇傾向で

あったことから、血管内皮細胞による EndMT に対して、これらの miRNA が関与している可能性が示唆された。今後 miR-155、miR-221、miR-222 が全身性強皮症の血管内皮細胞で上昇している機序や、これら miRNA が、血管内皮細胞の細胞増殖や細胞死、EndMT へ関与するかどうかさらに検討を行う予定である。将来的に、全身性強皮症の血管障害に対する miRNA の理解が進むことにより、病態解明へとつなげることを目標としていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------