

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870555

研究課題名(和文) 全身性強皮症の病態におけるmicroRNA let-7aの関与の検討

研究課題名(英文) The role of microRNA let-7a in systemic sclerosis

研究代表者

牧野 雄成 (Makino, Katsunari)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00433037

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)：本研究では、全身性強皮症の皮膚硬化にたいするmicroRNA let-7の関与を検討した。let-7aはⅠ型コラーゲンのmRNAを抑制的に作用し得るmicroRNAであるが、強皮症患者の血清や皮膚線維芽細胞では健常群と比べてlet-7aが低下しており、この低下はⅠ型コラーゲンの産生増強に関与していた。またブレオマイシン皮膚投与による強皮症マウスモデルにおいて、let-7aを投与すると皮膚硬化の減弱がみられた。強皮症の病態におけるmicroRNAの関与の検討は、今後新しい治療へつなげる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we demonstrated the role of microRNA let-7a against skin fibrosis in systemic sclerosis (SSc). The let-7a was the potent regulator of type I collagen. The let-7a levels in dermal fibroblasts and sera of SSc patients were lower than those in healthy control. This down-regulation of let-7a in SSc led to the overexpression of type I collagen. We confirmed that the improvement of bleomycin-induced dermal thickening by let-7a administration. Investigation of more detailed mechanisms of miRNA-mediated regulation of collagen expression may lead to new therapeutic approach against systemic sclerosis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 マイクロRNA let-7a 皮膚線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA(miRNA)が生体内で様々な遺伝子発現を調節することで細胞増殖や分化、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なっている。miRNA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1,000種類以上のmiRNAの存在が推測されている。miRNAは、主にイントロンにコードされ、RNAポリメラーゼによって転写される。この転写産物は核内、細胞質で修飾を受けて最終的に22塩基長程度の1本鎖のmiRNAとなる。成熟したmiRNA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。またmiRNAは血清中にも存在しており、血清miRNAがバイオマーカーとなる可能性が報告されている。

一方、全身性強皮症は、皮膚の硬化を主症状とし、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与して病態が形成されると考えられている。皮膚の硬化の主な要因は型コラーゲンを過剰に産生する線維芽細胞であるが、明らかな病因は不明である。全身性強皮症の病態におけるmiRNAの関与について、研究代表者はインテグリン α 5を標的とするmicroRNA、miR-142-3p血清値が全身性強皮症患者で上昇していることを報告し、本疾患における血清miRNA値のバイオマーカーとしての可能性を初めて報告した。

全身性強皮症の病態における、さらなるmiRNAの関与を検討するため研究代表者は全身性強皮症のパラフィン固定した硬化皮膚組織中からmiRNAを採取し、ヒト正常皮膚組織中のmiRNAとmicro arrayを用いて網羅的に各種miRNAの発現を比較した。その結果microRNA let-7aが全身性強皮症の皮膚組織で低下していることを見出した。let-7aが標的とする遺伝子は多岐に渡るが、細胞分化に関与し、悪性腫瘍の進展に関与することがこれまで報告されている。同時にlet-7aはその配列上、型コラーゲンの1鎖と2鎖のmRNAを標的とし得る。そこで、全身性強皮症の皮膚組織で低下していたlet-7aが本疾患の病態、特に皮膚線維芽細胞の過剰な型コラーゲン産生に寄与する可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は全身性強皮症の皮膚硬化の主因である過剰な型コラーゲン産生におけるlet-7aの関与につき検討し、さらにマウスの皮膚硬化モデルにおいてlet-7aを投与することで硬化が抑制されるかどうかを研究の目的とした。研究期間内に以下の解明を試

みた。

(1)micro arrayでは全身性強皮症の皮膚組織にてlet-7aは低下していたが、患者個別の皮膚組織におけるlet-7aの発現低下を確認する。

(2)全身性強皮症の組織中のどこでlet-7aが低下しているのか明らかにする。特に皮膚線維芽細胞での低下を予想しているため、ヒト組織から採取した培養皮膚線維芽細胞における発現を比較する。

(3)let-7aは型コラーゲンの1と2鎖の両方のmRNAを標的とし得るmiRNAである。そこでlet-7aが培養皮膚線維芽細胞の型コラーゲン産生を実際に抑制することができるか検討する。

(4)血清中のmiRNAが全身性強皮症の病態に関与する可能性を申請者はすでに報告したが、血清let-7a値についても測定し、正常ヒト血清と比較をする。

(5)マウス皮膚全体にmiRNAを過剰に発現させる手技はまだ報告がない。申請者は予備実験として、合成したmiRNAとアテロコラーゲン製剤を混合し、マウスの腹腔内に注射することで、数日間持続的に皮膚にmiRNAを強発現させることを見出していた。そこでlet-7aを皮膚で強発現させることで皮膚における型コラーゲン産生を抑制させ、全身性強皮症のマウスモデルにおける皮膚硬化を抑制し得るのか検討する。

(6)上記(5)に関連して、マウス皮膚だけではなく肺や肝臓など内臓の線維化についても検討する。具体的には組織切片からの膠原線維染色での比較や、組織中のヒドロキシプロリン量を測定することにより線維化の程度を比較する。

3. 研究の方法

(1)全身性強皮症の皮膚組織、培養皮膚線維芽細胞におけるlet-7aの発現の検討

全身性強皮症の皮膚組織、培養皮膚線維芽細胞におけるlet-7aの発現の検討

ホルマリン固定、パラフィン包埋皮膚組織切片から市販のキットを用いてmicroRNAを回収した。予備実験として、全身性強皮症3例と正常3例のmicroRNAを用いてmicroRNA arrayを行っており、let-7aが全身性強皮症で有意に低下していることを見出していた。サンプル数を増やし、個別の組織それぞれでlet-7aが低下しているかreal-time PCR法にて検討した。また皮膚組織のどこでlet-7aが低下しているか確認するため、皮膚切片を用いてlet-7aのin situ hybridizationを行った。

培養皮膚線維芽細胞における let-7a の発現の検討

全身性強皮症患者と健常人の皮膚より得た、培養皮膚線維芽細胞を用いて細胞中の let-7a 量を real-time PCR 法で比較した。

(2)培養皮膚線維芽細胞の Ⅰ型コラーゲン発現に与える let-7a の影響の検討

全身性強皮症の培養皮膚線維芽細胞において、let-7a が線維芽細胞の Ⅰ型コラーゲン代謝に影響を与えるか検討を行った。let-7a の作用を模した合成 mimic let-7a をリポフェクタミン試薬を用いて線維芽細胞に導入した後、蛋白を回収し、免疫プロット法にて Ⅰ型コラーゲン蛋白発現の変化を確認した。また実際 let-7a が Ⅰ型コラーゲン 1鎖と 2鎖の mRNA に結合し得るのかについて、ルシフェラーゼアッセイを行った。let-7a の阻害により、線維芽細胞での Ⅰ型コラーゲン産生が増加するか検討するため、市販の let-7a protector と let-7a inhibitor を使用した。let-7a protector は let-7a が Ⅰ型コラーゲン 1鎖と 2鎖の標的に結合する部位を特異的に阻害するものであり、let-7a inhibitor は let-7a 自体を阻害する試薬である。これらの試薬をリポフェクタミン試薬を用いて線維芽細胞に導入し、免疫プロット法にて Ⅰ型コラーゲン蛋白の発現をコントロールと比較した。

(3)全身性強皮症の血清 let-7a 値の測定。血清 let-7a 値と臨床所見の相関の検討

血清 let-7a 値の測定

全身性強皮症患者血清 50 例、正常血清 30 例、他の膠原病患者血清(全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎)20 例を使用した。血清より市販のキットを利用して total microRNA を抽出し、cDNA 化したのちリアルタイム PCR 法にて let-7a の相対定量を行った。microRNA の抽出率の相違を補正するために *C. elegans* 由来の合成 microRNA-59 をあらかじめ血清に添加した。

血清 let-7a 値と臨床所見の相関

血清 let-7a 濃度と、臨床症状の頻度や検査値異常に有意な相関があるか解析を行った。

(4)マウス皮膚での let-7a 強発現。プレオマイシン皮下注射マウス硬化皮膚モデルにおける、let-7a の強発現は皮膚硬化を抑制するかの検討

マウス皮膚での let-7a 強発現

let-7a の mature 鎖と minor 鎖をアニールした合成 microRNA を利用した。この合成 microRNA をアテロコラーゲン溶液と混合し、BALB/C マウスに腹腔内注射した。腹腔内注射後に背部皮膚から RNA を回収し、let-7a を real-time PCR 法にて測定すると、腹腔内注射から少なくとも 3-4 日後までは皮膚組織の let-7a はコントロール(コントロール

microRNA とアテロコラーゲン溶液の混合、合成 let-7a と PBS 溶液の混合)より有意に上昇していることを研究代表者はすでに確認していた。この方法を用いて皮膚での external な let-7a 強発現を行った。

プレオマイシン皮下注射マウス硬化皮膚モデルにおける、let-7a 投与の効果

プレオマイシンをマウス皮下に連日投与すると皮膚が硬化するが、これは全身性強皮症の皮膚硬化モデルの一つとしてすでに知られていた。プレオマイシン 100 μg を溶解した PBS 溶液 100 μl を 1 日 1 回 28 日間連日マウス皮下の同部位に注射して硬化皮膚を誘導した。プレオマイシン注射と同時に、上記のごとく let-7a 腹腔内投与を 4 日に 1 回行った。28 日間のプレオマイシン注射終了後に皮膚を回収し、皮膚厚測定やヒドロキシプロリン量によるコラーゲン量の測定、免疫染色による炎症細胞浸潤の数、let-7a の in situ hybridization、コラーゲン代謝に関わるサイトカイン量の real-timePCR 法による測定の解析を行った。

4. 研究成果

全身性強皮症の硬化皮膚では、主に皮膚線維芽細胞が産生する Ⅰ型コラーゲンの過剰な沈着が生じているが、その機序は不明である。本研究では、microRNA let-7a がこの過剰な Ⅰ型コラーゲンに産生に関与しているか検討した。microRNA アレイにより、microRNA let-7a が全身性強皮症の皮膚組織で低下していることを見出し、この低下が皮膚線維芽細胞において生じていることを real-time PCR 法や In situ hybridization 法で確認した。また血清中の let-7a 量についても検討し、全身性強皮症の硬化の強い患者において、血清 let-7a 量は減少傾向であった。次に let-7a が皮膚線維芽細胞において実際 Ⅰ型コラーゲン蛋白量を変化させるのか検討した。合成した let-7a を線維芽細胞に導入すると Ⅰ型コラーゲン量は減少し、逆に let-7a の阻害剤を導入すると Ⅰ型コラーゲン量は増加した。以上より強皮症の皮膚線維芽細胞における let-7a 低下が、過剰なコラーゲン産生に関与していると考えられた。次に強皮症の硬化皮膚で let-7a を増やすことができれば硬化が改善するのではと推測し、プレオマイシン硬化皮膚マウスモデルで検討した。プレオマイシンを局所注射することで誘導した硬化皮膚においても let-7a は減少していた。アテロコラーゲン製剤と合成 let-7a を混合し、マウス腹腔内に注射すると、少なくとも 3 日間は皮膚における let-7a 量が増加することを見出した。この let-7a 腹腔内注射を行いながらプレオマイシン局所注射と let-7a 腹腔内注射を行うと皮膚硬化は軽減していた。

以上全身性強皮症の皮膚線維芽細胞において microRNA である let-7a が低下しており

let-7a の低下は 型コラーゲンの過剰な産生に關与していた。プレオマイシン投与による皮膚硬化マウスモデルにおいて、let-7a を腹腔内投与し、皮膚での発現を増強させると皮膚の硬化が抑制された。全身性強皮症の病態における let-7a のさらなる關与の検討は、今後有用な治療へとつながる可能性があると考えられた。

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 3 件)

Serum levels of soluble carbonic anhydrase IX are decreased in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis compared to those with limited cutaneous systemic sclerosis

Makino K, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H.

Biosci Trends、2014、8 卷、144-8、査読有
DOI: 10.5582/bst.2014.01020

Knockout of endothelial cell-derived endothelin-1 attenuates skin fibrosis but accelerates cutaneous wound healing

Makino K, Jinnin M, Aoi J, Kajihara I, Makino T, Fukushima S, Sakai K, Nakayama K, Emoto N, Yanagisawa M, Ihn H.

PLoS One、2014、May 22;9(5):e97972、査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0097972

The Downregulation of microRNA let-7a Contributes to the Excessive Expression of Type I Collagen in Systemic and Localized Scleroderma

Makino K, Jinnin M, Hirano A, Yamane K, Eto M, Kusano T, Honda N, Kajihara I, Makino T, Sakai K, Masuguchi S, Fukushima S, Ihn H.

J Immunol、2013、190 卷、3905-15、査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1200822

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 雄成 (MAKINO, Katsunari)

熊本大学・医学部附属病院・

非常勤診療医師

研究者番号：00433037

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：