

# 檜山 和也 論文内容の要旨

主 論 文

## **miR-196a downregulation increases the expression**

### **of type I and III collagens in keloid fibroblasts**

(マイクロ RNA-196a の発現低下はケロイド由来線維芽細胞において

I 型及びIII型コラーゲンを増加させる)

檜山和也、光武範吏、松瀬美智子、荻朋男、ウラジミール・サエンコ、  
氏福健太、宇谷厚志、平野明喜、山下俊一

Journal of Investigative Dermatology.  
(in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：平野 明喜 教授)

## 緒 言

ケロイドは、軽微な外傷を契機に発生する異常線維化を伴う隆起性病変であり、掻痒感や時に強い痛みを伴う。その病態の主体はコラーゲン等の細胞外マトリックスが線維芽細胞で異常産出されて、細胞外に蓄積されることと考えられているが、はっきりとした病態は未だ解明されていない。

マイクロ RNA (microRNA・miRNA)は、平均 22 塩基からなる一本鎖のノンコーディング RNA である。標的メッセンジャーRNA (mRNA)の 3'非翻訳領域に結合して翻訳を阻害し、遺伝子の発現を負に制御する働きを持つ。一つの miRNA は同時に数多くの様々な遺伝子の発現に影響を与えていると考えられている。近年、各種臓器の線維化や細胞外マトリックス産出への miRNA の関与が報告されており、ケロイド発生にも特定の miRNA が関与している可能性が考えられ、それを明らかにする研究を計画した。

## 対象と方法

倫理委員会承認の下に、実験に必要なケロイド及び正常皮膚の組織を臨床検体より得た。ケロイドと正常皮膚の miRNA 発現比較を、組織より採取したケロイド由来線維芽細胞 (KF) と正常線維芽細胞 (NF) を用いて miRNA マイクロアレイ及び TaqMan リアルタイム RT-PCR で行った。miRNA の標的遺伝子の検索を 3 つのウェブデータベースを用いて行った。予測された標的遺伝子の mRNA の発現比較を、リアルタイム RT-PCR で行った。同定された miRNA の機能評価を miRNA の過剰発現及びノックダウンの下にウエスタンブロッティングとレポータープラスミドを使用したルシフェ

ラーゼアッセイで行った。miRNA の発現量変化に対する DNA メチル化の関与の有無をメチル化特異的 PCR 法で検討した。

## 結果と考察

miRNA マイクロアレイ及び TaqMan リアルタイム PCR を使用した KF と NF の miRNA 発現比較は、KF ではマイクロ RNA-196a (miR-196a)の発現抑制とマイクロ RNA-142-3p (miR-142-3p)の発現増加があることを示した。また、これらの miRNA の発現が培養環境の影響を受けて変化することも示した。ウェブデータベースを用いた標的遺伝子の検索は、miR-196a がケロイド病態の中心的役割を担っていると考えられている I 型及び III 型コラーゲンを標的遺伝子として持つ可能性があることを示した。また、I 型及び III 型コラーゲン mRNA の発現比較は、KF では miR-196a の発現低下に対応する形で I 型及び III 型コラーゲン mRNA の発現が増加していることを示した。この結果、ケロイドでのコラーゲンの過剰産出に miR-196a の発現抑制が関係している可能性あることが示された。miR-196a の過剰発現及びノックダウン下に行ったウエスタンブロットティングは、miR-196a が I 型及び III 型コラーゲンの発現に影響を持つことを示した。また、COL1A1 及び COL3A1 の 3'非転写領域を含んだレポータープラスミドを使用したルシフェラーゼアッセイも miR-196a が I 型及び III 型コラーゲン遺伝子の発現に影響を持つことを示した。メチル化特異的 PCR 法は、ケロイドでの miR-196a の発現低下には DNA メチル化が無関係であることを示した。

以上より、miR-196a が皮膚線維芽細胞で I 型及び III 型コラーゲンの発現に関与していることが示され、miR-196a の発現低下がケロイドにおけるコラーゲンの過剰産出の原因の一つであることが確認された。また、miR-196a を標的とする治療が皮膚線維化の治療に結びつくことが示唆された。