

【要約】

Increase of hsa-mir-144-3p in umbilical cord blood is
associated with the development of
atopic dermatitis in infancy

(臍帯血中の hsa-mir-144-3p の上昇は乳児期のアトピー性皮膚炎の発症に関連する)

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences
Chiba University

Field of study: Frontier Medicine and Pharmacy
Academic supervisor: Prof. Naoki Shimojo

Eishika Dissanayake

緒言

アトピー性皮膚炎（AD）は、小児期の代表的な慢性炎症性疾患であり、患者および保護者に大きな負担をもたらすことが知られている。先進国におけるADの罹患率は横ばいではあるが、10-20%であると推定されている。一方、発展途上国においては罹患率こそ低い上昇傾向にある。ADのほとんどの症例（60%）は乳児期に発症し、大部分は数年以内に寛解するが、成人期に至っても症状の改善がみられない場合がある。また、早期に寛解した症例でも、皮膚の過敏性は残存し、ADの再燃を認めることがある。近年、二重抗原曝露仮説が提唱され、アレルゲンの高用量の経口曝露によって免疫寛容が誘導され、低用量の経皮曝露によって感作が誘導される可能性が示されている。このことから、乳児期のADは、後の食物アレルギー発症のリスクファクターになりうるということが考えられる。そして、ADの早期発症および悪化を予防するためには、ADの発症や進行の抑制因子を解析することが重要である。

ADの皮膚は、脂質組成の変化、タイトジャンクションの数の減少、プロテアーゼ活性の変化および抗菌活性の変化を含む、バリア機能のいくつかの異常によって特徴づけられており、微生物感染およびアレルゲン感作を起こしやすい。それにも関わらず、バリア機能の面で主要な役割を果たすケラチノサイトに特異的に起きる、初期の変化についてはほとんど知られていない。

マイクロRNA（miR）は、短い（～22ヌクレオチド）非翻訳性RNAであり、主に転写後遺伝子調節に関与している。また、MiRはアレルギー性疾患を含む多くの疾患の病因に関与していることが報告されている。そこで本研究では、ADを発症した小児に、早期に認められるmiR発現異常を解析し、そのケラチノサイトへの影響を調べることを目的とした。

結果

1歳でADを発症した児では、臍帯血 miR-144 が上昇している

ADを発症した児の母体血清（MS）および臍帯血清（CS）に見られる miR の違いを同定するために、AD 発症児 18 人と AD 非発症児 18 人の児と母親の組を、傾向スコアマッチングにより選択した。選択した集団における児および母親の背景因子は、母集団との間に有意な違いを認めなかった。

我々は 179 個の miR の発現プロファイルを分析し、PLS 回帰解析（partial least squares regression）を用いて、1 歳での AD 発症に関連した miR を同定した。さらなる評価のために、VIP スコアが 1.5 以上の miR を AD 発症に関連する候補 miR として選択した。

さらに、リアルタイム定量 PCR（qPCR）による血清 miR 発現解析を行ったところ、miR-144 は 1 歳で AD を発症した児の CS において、有意に高値であることが示された。この違いは、妊娠 36 週の MS または 1 歳児の血清では観察されなかった。MS と CS における miR 発現には相関は認められず、MS 中の miR が乳児に直接的な影響を及ぼさないことが示唆された。また、CS における miR-144 発現は、1 歳時での総 IgE レベルとは関連せず、miR-144 はアトピー素因とは無関係に AD の病因に関与することを示唆された。このため、ケラチノサイトに CS 中の miR の役割について、さらに研究をすすめた。

ABCA1 は miR-144 の標的遺伝子である

MicroRNA.org、TargetScan および miRBase 解析により、miR-144 の候補標的遺伝子の一つとして、ATP-binding cassette protein A1（ABCA1）が挙げられる。ABCA1 は細胞からのコレステロール流出に関与し、miR-144 は ABCA1 発現を抑制することで、細胞内のコレステロールの蓄積をもたらすことが示されている。そこで我々は、ケラチノサイトにおける ABCA1 の発現に対する miR-144 の効果を検討するために、ヒト上皮ケラチノサイトに miR-144 を導入し、ABCA1 の発現を検討した。MiR-144 導入ケラチノサイトでは、ABCA1 の mRNA およびタンパク質発現の低下が認められた。また、miR-144 導入ケラチノサイトでは、細胞内コレステロールの蓄積が認められた。

MiR-144 導入ケラチノサイトでは、ダニ（HDM）刺激により NF- κ B p65 サブユニットの核内移行が誘導される

ABCA1 をノックアウトしたマクロファージでは、TLR アゴニストに対するコレステロールの蓄積および過剰なサイトカイン応答を引き起こすことが示されている。この過剰な応答は、全ての MyD88 依存性 TLR（TLR2,4,7 および 9）の脂質ラフトへの移行の亢進による下流シグナルの増強と、NF- κ B およびアクチベーター

タンパク質-1 (AP-1) シグナルを介した向炎症性サイトカイン産生の増強によるものと考えられている。このため、ABCA1 の発現の抑制が認められる miR-144 導入ケラチノサイトにおいて、AD における炎症誘因因子であるダニ (HDM) 刺激に対する反応を検討したところ、miR-144 による HDM 刺激による NF- κ B p65 サブユニットの核内移行の増強が認められた。

MiR-144 導入ケラチノサイトへの HDM 刺激は human beta-defensin 2 (hBD-2) の mRNA 発現増加を導く

MiR-144 導入ケラチノサイトにおいて、NF- κ B 活性化に応答した向炎症性サイトカイン産生認めなかったため、我々は NF- κ B 活性化を介して AD の病因に関与する他の分子について検討した。Anti-microbial peptide (AMP) は上皮に存在する、直接の抗菌活性を示す小さなカチオン性ペプチドであり、抗原提示、サイトカイン放出およびバリア機能の回復にも役割を果たすことが示されている。AD に関与する AMP には、誘導性 β デフェンシン hBD-2 および 3、およびカテリシジン LL-37 が含まれる。いくつかの研究は、AD における AMP 産生の減少を示すが、他の研究は、AD の慢性病変と比較して急性病変における分泌の増加を示す。さらに、hBD は、ケラチノサイトからの炎症性サイトカインの産生を誘導し、マスト細胞の化学誘引物質として作用し、掻痒誘発メディエーターの放出を誘発し、血管透過性を増加させることが知られている。実際、hBD 2 レベルは、非病変皮膚と比較して病変角質層で有意に高いことが示され、SCORing of Atopic Dermatitis (SCORAD) と trans-epidermal water loss (TEWL) のスコアリングと相関する。我々は、miR-144 導入 HPEK を HDM 抽出物で刺激した場合、hBD-2 の mRNA 発現が有意に増加することを観察した。さらに、HDM に加えて NF- κ B 阻害剤 JSH-23 を追加すると、導入細胞における hBD-2 発現量が抑制された。Human beta-defensin 3 および LL-37 mRNA レベルは、HDM 刺激に反応して有意に変化しなかった。hBD-2 産生は NF- κ B 活性化により増加することがこれまで示されており、我々が観察した hBD-2 mRNA レベルの有意な増加は、NF- κ B 活性化の介している可能性が考えられた。

考察

近年、MiR は、疾患病因およびバイオマーカーとしての意義について、研究されてきている。それにも関わらず、アレルギー疾患における miR の役割については知見が不足している。この研究では、miR-144 が 1 歳で AD を発症した児の臍帯血で高値であることを明らかにした。MiR-144 は ABCA1 を標的遺伝子としており、また miR-144 のケラチノサイトへの導入は、ABCA1 の発現を減少させ、コレステロールの蓄積をもたらした。MiR-144 誘導性コレステロール蓄積は、THP-1 マクロファージにおいて向炎症性サイトカイン産生を誘導することが示されている。しかし、血清中の TNF- α 、TSLP、IL-25、IL-17A、IL-17F、IL-33 レベル、またはトランスフェクトされたケラチノサイトにおける mRNA レベルの有意な変化は検出されなかった（データは示さず）。さらに、導入ケラチノサイトの培養上清中で TNF- α は検出されなかった。

乾癬や別の慢性炎症性皮膚疾患では、コレステロールの蓄積は、ケラチノサイトにおける IL-17A シグナル伝達を促進することも示されている。Th17 細胞で産生されるサイトカインである IL-17A は、LL-37 を含む他の関連分子の増加に伴って、正常および成人 AD の皮膚とは対照的に、早発性の小児 AD 皮膚病変において高度に発現している。我々は血清中にサイトカインの変化を見出さなかったが、その変化は早期 AD の皮膚を解析すれば認める可能性がある。また、マスト細胞の非 IgE 媒介性刺激におけるカチオン性ペプチドの役割を同定する証拠が増えている。miR-144 が血清 IgE レベルと相関しないという我々の知見は、早期の皮膚バリア機能障害が IL-31 などのマスト細胞由来サイトカインによって補助され得るという事実を支持する。これは、最初の活性化が、皮膚の常在自然免疫細胞に由来し得ることを示唆している。

私たちの研究にはいくつか限界が存在する。我々は、miR-144 がケラチノサイトを標的とするという前提でこの研究を行った。我々は、試料を得ることができなかったため、児の皮膚における miR または他の下流分子の変化を調べられなかった。また、我々は HDM に対するケラチノサイト応答のみを検討しただけであるが、AD の病因に重要な役割を果たす黄色ブドウ球菌に対する応答を調べる必要がある。

現在のところ、AD においてバリア機能の損傷を引き起こす最も初期のトリガーについての知識はほとんどない。この小児期疾患の発症を防ぐためには、可能であれば、AD を識別・診断し、治療することが不可欠である。したがって、miR-144 が臍帯血で上昇するという私たちの主な発見は、早期の AD 発症寄与因子の理解に重要な手がかりを与え、この疾患の理解に新しい次元を加えるものと考えている。