

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10943

研究課題名(和文) MicroRNAとマクロファージ異常：難治性創傷の炎症遅延に及ぼす影響

研究課題名(英文) MicroRNA and macrophage dysregulation: role in prolonged inflammation of chronic non-healing wounds

研究代表者

マドゥエスタ ラダ (Madhyastha, Radha)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80381078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性創傷における炎症期の遅延に対しmicroRNA (miRNA)の役割及びその機構を明らかにすることにした。マウスマクロファージ細胞を用いた実験により、炎症に関する幾つかのmicroRNAの発現変換が見られた。特にmicroRNA-21(miR-21)がマクロファージ細胞において炎症を起こして炎症遅延に影響を及ぼすことが確認できた。更に、miR-21がRANKLによるマクロファージの破骨細胞分化に重要であることと、抗炎症作用を持つaloin(アロエ由来成分)により抑制されることが確認した。

研究成果の概要(英文)：This research project focused on deciphering the role of microRNA and macrophage dysregulation in prolonged inflammation phase of non healing chronic wounds. Employing mouse macrophage cells, we confirmed a set of inflammation-related microRNAs that are dysregulated in hypoxia condition. Among them, miR-21 was profound and induced prolongation of inflammatory phase. miR-21 was found to be necessary for RANKL-induced differentiation of macrophages into osteoclast cells. This function was inhibited by aloin, a derivative of aloe.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：microRNA 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 組織の修復、再生には組織障害により起こる急性炎症反応が重要である。特に炎症期に補充されるマクロファージ細胞が組織修復に重要な役割をもつ。マクロファージは細菌や死滅細胞を貪食するうえ血管新生、基質沈着、走化性サイトカインおよび増殖因子の分泌にとって不可欠である。通常の創傷治癒初期にマクロファージは炎症促進性の M1 形質を持つが、炎症期後半に抗炎症性の M2 形質に変換する。M1 マクロファージは細菌の貪食または炎症促進性サイトカインである IL-6、TNF、IL-1、IL-2 を分泌し、炎症環境を保つ。M2 マクロファージは抗炎症性サイトカインである IL-10、細胞増殖因子である TGF- $\beta$ 1、VEGF、EGF、細胞外基質 ECM 蛋白を分泌し、血管新生を促進し、創傷治癒過程を次の段階へ進展させる。マクロファージの M1 から M2 への変換が創傷の増殖期への進展にとって重要である。

(2) 難治性創傷の場合炎症期が遅延し、正常の治癒機転が働かないことはよく知られている。細胞レベルで見ると、急性炎症細胞増加とともに線維芽細胞、血管内皮細胞、ケラチン細胞の増殖不全、コラーゲン合成低下、血管新生および再上皮化の遅延が認められる。糖尿病における創傷部位では、M1 マクロファージが多くみられて、炎症細胞活性化に異常が観察されている。糖尿病における創傷部位ではマクロファージの M1 から M2 表現型への変換が障害されていることが糖尿病型マウスを用いた研究で明らかとなっている。難治性創傷部位に存在する炎症促進性 M1 マクロファージの持続性に関与する因子がいまだ不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 最近、低分子 RNA である microRNA が様々な疾患に関与することが次々と明らかになってき

た。MicroRNA は 18-25 塩基からなる低分子 RNA であり、標的 mRNA の機能を抑制することで、多くの生命現象を制御している。組織の修復、再生に microRNA が機能的な役割を持つことが明らかになってきた。これまで申請者は、糖尿病性創傷治癒の遅延に幾つかの microRNA が関与していることを示唆した。糖尿病性創傷を含む難治性創傷に起こる炎症期の遅延に microRNA がどのように関与しているかは未知である。本研究では、難治性創傷における炎症期の遅延に対し microRNA の役割およびその機構を明らかにすることを目的とした。糖尿病は世界的に患者数が急増している疾患であり、経済的影響も計り知れないものがある。糖尿病性難治性創傷は重要な合併症であり、患者の QOL に与える影響も大きい。本研究より得られた結果は、miRNA を介したマクロファージ異常と炎症期の遅延との関連に新たな知見を与え、難治性創傷治癒不全と関連する複雑な分子ネットワークを理解するために重要な情報が得られると期待している。

## 3. 研究の方法

(1) *In vivo* および *in vitro* の実験系により、遅延性炎症期に存在する M1・M2 マクロファージの microRNA・サイトカイン・増殖因子・細胞外基質蛋白 (Collagen, Fibronectin, Vimentin, MMPs, TIMPs) を継時的に追跡し、炎症遅延によるサイトカイン・増殖因子制御、マクロファージの走化性制御について Real Time PCR・演繹プロット方法により解析を進め、M1 マクロファージでのどの miRNA がどのような条件下で炎症期の遅延に関わるかを明らかとする。

(2) さらに、microRNA によるマクロファージ改善・難治性創傷治癒の有用性検証である。炎症期の遅延に関与する microRNA の前駆物質又は拮抗物質を M1 マクロファージ内へ導入し、それぞれ microRNA 過剰発現およびノックダウン細

胞を作成する。Flow cytometry あるいは免疫蛍光法を用いて、M1 マクロファージが M2 へ形質変換されるかどうかを検討する。さらにマクロファージ改善による走化性、サイトカイン、増殖因子制御に与える影響を PCR・免疫プロットにより検定する。これでどの microRNA がどの条件下でマクロファージの形質異常に関与していることを明らかとする。その中から強い関与が示唆された microRNA を選び、*in vivo* 実験を行う。

(3)*In vivo* 実験による難治性創傷治癒における microRNA の意義:糖尿病性マウス皮膚に皮膚生検用パンチを用いて創傷を作成する。選んだ microRNA の前駆物質含むプラスミドあるいは拮抗物質を投与し、4日後、創傷周辺組織を採取する。採取した組織を用いて、M1・M2 マクロファージの表現、炎症性サイトカインである IL-6、TNF、IL-1b の発現、抗炎症性サイトカインである IL-10、IL-4、Arginase1・増殖因子の発現、細胞外基質再構築に必要である ECM 蛋白の発現を PCR 法および免疫プロット法・IHC 法より検証する。

以上より、難治性創傷において microRNA がマクロファージの形質異常を介した炎症期の遅延に及ぼす影響を明らかにすることが出来ると考えられる。

#### 4. 研究成果

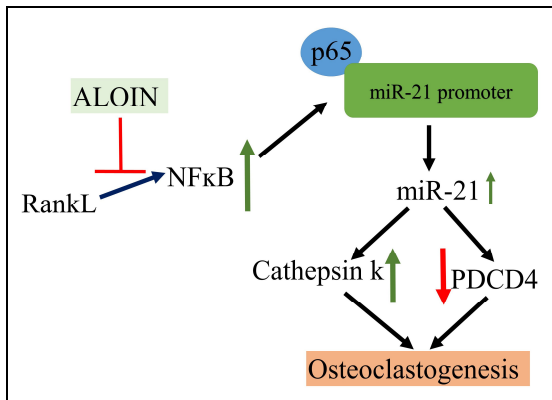
(1) 難治性創傷の場合、細胞が低酸素 hypoxia と高糖 high glucose 条件に囲まれているため、マウスマクロファージ細胞を用いて hypoxia+high glucose 条件での細胞炎症に関連する幾つかの microRNA を検定した。Hypoxia+high glucose 環境により miR-21・miR-27a・miR-29a・miR-29b・miR-146b の発現変換が見られた。それぞれ miRNA の hypoxia 条件下での transcription factor である NFkappaB・AP1 と HIF1 蛋白質を介しての発現制御がみられた。さらに、増殖因子

TGF- $\beta$ 1 また抗炎症剤である sulforaphane により発現調節されていることが分かった。

(2) miR-21 の場合、解析したところ primary miR-21、precursor miR-21、mature miR-21 それぞれが hypoxia の影響を受けていることが確認できた。Hypoxia 条件下での JNK シグナル伝達経路下 NFkappaB・AP1 と HIF1 蛋白質を介しての発現制御がみられた。miR-21 がマクロファージの M1 (炎症性) マーカー蛋白質である TNFalpha、iNOS、IL-6、IL-1b の発現増加と M2(抗炎症性)マーカー蛋白質である IL-10、IL-4、Arginase1 の発現低下を及ぼすことが分かりました。

(3) 静止状態の M0 型マクロファージ又は抗炎症性機能を持つ M2 マクロファージへ miR-21 の前駆物質を導入した実験では miR-21 の影響で TNFalpha、iNOS、IL-6、IL-1b の発現増加により M2 マクロファージが M1(炎症性)へ形質変換されることがわかりました。一方、miR-21 は創傷治癒に重要である繊維芽細胞での増殖因子 (Bmp、FGF、TGFBeta、VEGF)・細胞外基質蛋白の発現増加に影響を与えての細胞増殖・遊走を促進することが確認できた。だが、マクロファージ細胞では炎症を起こして炎症期遅延に影響を及ぼすことが本研究で確認できた。

(4) miR-21 が RANKL によるマクロファージの破骨細胞分化に重要であることと、抗炎症作用を持つ aloin(アロエ由来成分)の NFkappaB 抑制作用により制御されることを明らかにした。miR-21 は破骨細胞の抑制因子である PDCD4 の抑制と共に破骨細胞活性マーカーである cathepsin K の上方制御に働き、破骨細胞分化に重要な役割を持つことと、aloin によりこの機構 (RANKL - NFkappaB 活性化 - miR21 発現増加 - PDCD4 抑制・CathepsinK 上方制御 - 破骨細胞分化)が障害されることが明らかにした。



## 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)

[学会発表] (計 1 件)

1) Madhyastha Radha, Harishkumar Madhyastha, Yutthana Pengjam, Yuichi Nakajima, Masugi Maruyama: Aloin prevents osteoclastogenesis via downregulation of microRNA-21. 22<sup>nd</sup> International Conference of Functional Foods and Chronic Diseases in Health: Science and Practice, Harvard Medical School, Boston, USA (2017)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 マドゥエスタラダ (Radha Madhyastha)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 80381078