

令和元年9月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05493

研究課題名(和文) 組織修復制御に資する炎症性低分子RNAの包括的機能解析及び新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for wound inflammation-related miRNAs and development of novel therapies

研究代表者

森 亮一 (MORI, Ryoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30509310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症関連 miR-223 機能解析を行った。その結果、miR-223 欠損 (miR-223Y/-) 好中球は、過剰な活性化と相まって、無菌性皮膚創傷治癒を遅延させることをみいだした。一方、S. aureus 感染 miR-223Y/- マウスは、膿瘍形成の促進を伴って、皮膚創傷治癒が促進した。また、miR-223 標的遺伝子である Interleukin-6 の発現上昇を認めた。miR-223 KO 好中球移植及び miR-223 アンチセンスオリゴ塗布は、S. aureus 感染創を改善した。好中球における miR-223 の発現は、転写因子 C/EBP によって制御されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、感染を具備した炎症・組織修復並びに治癒後に生じる癬痕形成の分子メカニズムの一端を解明できた。そして、黄色ブドウ球菌感染創改善効果のあるアンチセンスオリゴ(分子標的医薬)及び細胞移植法を開発した。

本研究成果は、創傷治癒促進・癬痕形成減弱・治癒後の精神的ストレスからの解放(いわゆる見た目の美しさ)に寄与すると考えられる。そして、世界中に存在する上記症状をもつ人々の悩み克服に繋げたい。また、医療費削減効果及び貧困地域への低価格な医療提供を介して社会貢献にも繋げる。

研究成果の概要(英文)：Argonaute 2 bound mature microRNA (Ago2-miRNA) complexes are key regulators of the wound inflammatory response, acting by translational processing of target mRNAs. In this study, we identified inflammation-related Ago2-miRNAs, miR-223, is key for infection control. MiR-223Y/- mice exhibit delayed sterile healing, with prolonged neutrophil activation and interleukin-6 expression, but showed considerably improved repair of S. aureus infected wounds. We also show that expression of miR-223 is regulated by C/EBP in human neutrophils after exposure to S. aureus peptides. Treatment with miR-223Y/- -derived neutrophils, or miR-223 antisense oligodeoxynucleotides in S. aureus infected wild-type wounds leads to markedly improved healing of these otherwise chronic, slow healing wounds. This study reveals how miR-223 regulates the bactericidal capacity of neutrophils at wound sites, and indicates that targeting miR-223 might be of therapeutic benefit for infected wounds in the clinic.

研究分野：創傷治癒学

キーワード：microRNA アンチセンスオリゴ インターロイキン6 炎症 黄色ブドウ球菌 好中球 細胞移植 皮膚創傷治癒

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷治癒後には、癒痕が形成される。しかし、胎生期の皮膚創傷修復部位では癒痕形成されず、皮膚組織が完全に再生する。その際、創傷部位に炎症細胞の集簇が観察されないことから、炎症細胞が癒痕形成に深く関与していると示唆されているが、その詳細な分子メカニズムは未だ解明されていない。

microRNA (miRNA) は、既存遺伝子と同様に核内で転写される。その後、細胞質へ移行し様々な修飾を受けて最終的に Argonaute2 (Ago2) 蛋白質と複合体を形成して標的 mRNA に作用し、翻訳阻害を導いて蛋白質発現抑制に関与する。miRNA は生命恒常性維持から病態発症など多彩な生命現象へ関与が多数報告されている。従って miRNA の機能解明は、様々な分野において重要性が増している。

糖尿病・肥満・免疫異常の患者は、創傷治癒遅延のリスクが高い。その原因は血管機能障害など様々であるが、主要原因の一つとして適切な免疫・炎症反応の崩壊が考えられる。病態が重症化した場合は、治癒困難な難治性皮膚潰瘍を発症する。難治性皮膚潰瘍は、創部が長期にわたり露出状態となっているため感染しやすい。さらに、免疫機能低下と相まって、皮膚常在菌として知られている黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が創部で異常増殖する。長期 *S. aureus* 感染は、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) などの多剤耐性菌出現の原因ともなるため、院内感染を防ぐ観点からも、適切な *S. aureus* 感染創の治療は重要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症・組織修復並びに治癒後に生じる癒痕形成の分子メカニズム解明を、皮膚創傷モデルを用いて行う。その研究結果を基盤として、外傷並びに炎症性疾患の治癒改善に効果のある分子標的医薬品を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 皮膚創傷治癒モデルマウス

マウス背部を剃毛し、直径 4 mm の皮膚打ち抜き損傷を施し作製した。その後、経時的に創傷部位を摘出し (直径 6 mm)、病理学的検査や分子細胞生物学的解析などを行った。

#### (2) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 感染モデルマウス

(独) 製品評価技術基盤機構より *S. aureus* 基準株を入手した。創傷を作製したのち、*S. aureus* ( $1 \times 10^8$  CFU/10  $\mu$ L) を速やかに滴下し、モデル動物を作製した。

#### (3) アンチセンスオリゴ (AS ODN) の作製

標的遺伝子のバイオインフォマティクス解析を行い、LNA (locked nucleic acid) 修飾型 AS ODN 作製した。

#### (4) *S. aureus* 感染皮膚創部への AS ODN 塗布及び好中球移植

30% puluronic gel または poloxamer P407/P188 binary thermosensitive hydrogel (PB gel) に 10  $\mu$ M アンチセンスオリゴを含ませ、50  $\mu$ L 投与し観察、病理学的検査や分子細胞生物学的解析などを行った。

一方、骨髄より磁気ビーズ抗体 (ミルテニー社) を用いて好中球を精製し、好中球 ( $10^6$  個/50  $\mu$ L 生理食塩水) を投与し観察、病理学的検査や分子細胞生物学的解析などを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) miR-223 遺伝子欠損 (Y/-) マウスは *S. aureus* 感染皮膚創傷治癒が促進する

miR-223 Y/- 好中球は、過剰な活性化と相まって、無菌性皮膚創傷治癒を遅延させることをみいだした。したがって、病原体排除のために一時的に過度な炎症を必要とする環境では、miR-223 KO 好中球は病原体排除に有効であると考えられる。そこで、*S. aureus* 感染モデルを用いて解析を行った。その結果、*S. aureus* 感染 miR-223 Y/- マウスは、皮膚創傷治癒が促進した (図 1)。また、膿瘍形成も促進していた (図 2)。

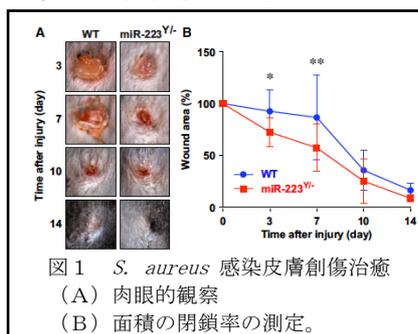


図 1 *S. aureus* 感染皮膚創傷治癒  
(A) 肉眼的観察  
(B) 面積の閉鎖率の測定。

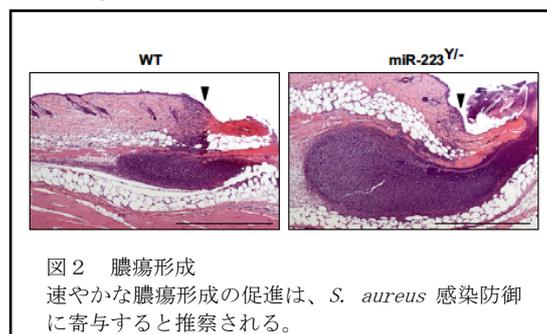
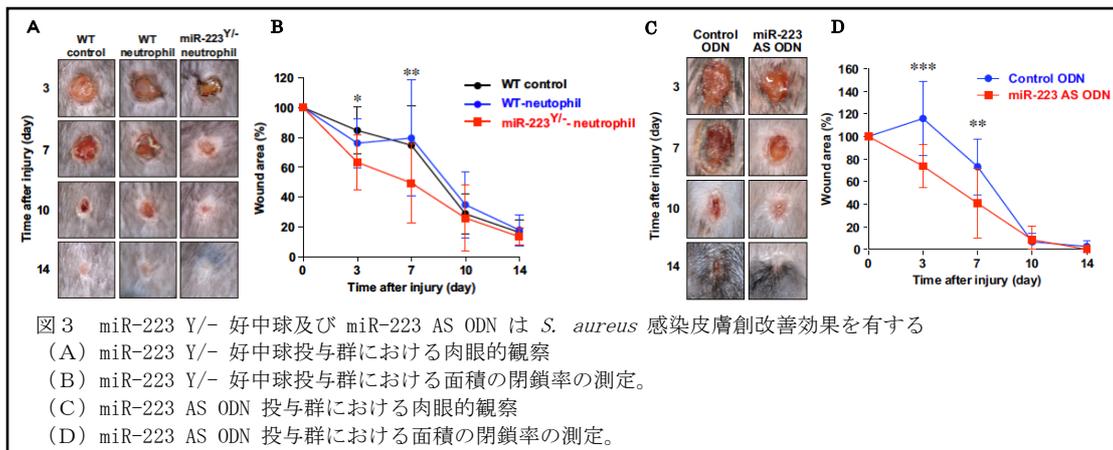
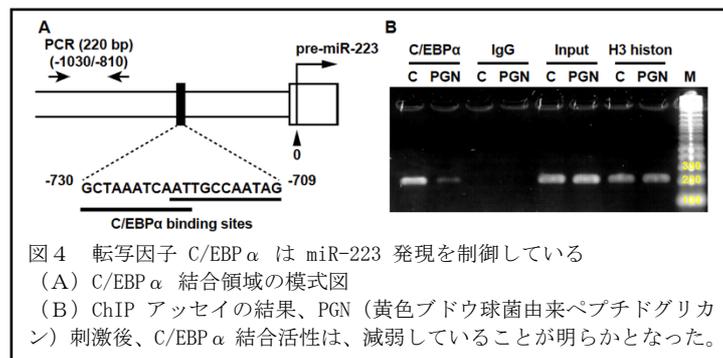


図 2 膿瘍形成  
速やかな膿瘍形成の促進は、*S. aureus* 感染防御に寄与すると推察される。

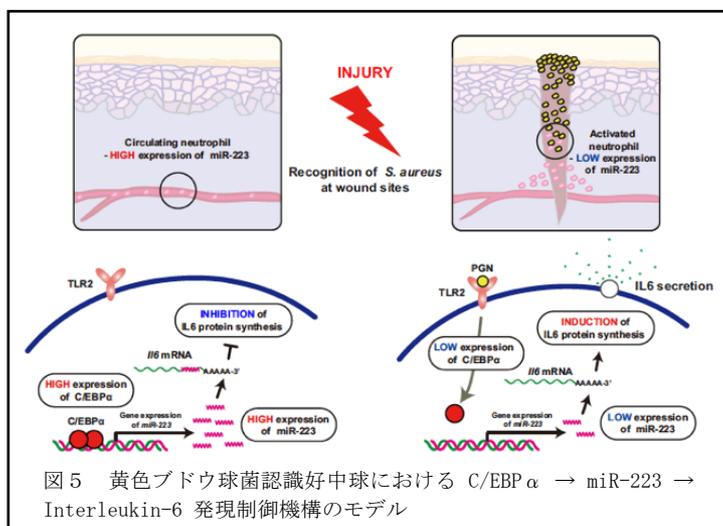
(2) miR-223 Y<sup>-/-</sup> 好中球及び miR-223 AS ODN は *S. aureus* 感染皮膚創改善効果を有する  
次に治療への応用をめざし、細胞移植及び AS ODN の開発を行った。その結果、miR-223 Y<sup>-/-</sup> 好中球移植及び miR-223 AS ODN 塗布は、*S. aureus* 感染創を改善した (図 3)。



(3) 転写因子 C/EBP $\alpha$  は miR-223 発現を制御している  
ヒト好中球モデル細胞株 (HL-60) を用いて miR-223 発現制御機構の解明を行った。クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を用いた解析によって、*S. aureus* を認識した HL-60 における miR-223 発現は、C/EBP $\alpha$  によって制御されていることが明らかとなった (図 4)。



本研究により、活性化好中球では、転写因子 C/EBP $\alpha$   $\rightarrow$  miR-223  $\rightarrow$  Interleukin-6 発現シグナル伝達制御を介して、創傷治癒・瘢痕化・*S. aureus* 排除に重要な役割を担っている事を示した (図 5)。今後は、miR-223 発現制御に資する化合物同定等を行い、miR-223 の人為的制御による有効な治療法の開発に繋がりたいと考えている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① Park S, Nayantai E, Komatsu T, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. Targeting NPY deficiency prevents postmenopausal adiposity by augmenting estradiol-mediated browning. *Journal of Gerontology: Biomedical Sciences & Medical Sciences*, 査読有, in press  
DOI:10.1093/gerona/gly282
- ② Umehara T, Mori R, Mace KA, Murase T, Abe Y, Yamamoto T, Ikematsu K. Identification of Specific MicroRNAs in Neutrophils of type 2 Diabetic Mice: Overexpression of *microRNA-129-2-3p* Accelerates Diabetic Wound Healing. *Diabetes*, 査読有, 68, 617-630, 2019.  
DOI:10.2337/db18-0313
- ③ 森 亮一、朴 盛俊、下川 功、栄養と加齢—基礎研究より—、栄養、査読無、3巻、233-237、2018。  
DOI 無し
- ④ de Kerckhove M, Tanaka K, Umehara T, Okamoto M, Kanematsu S, Hayashi H, Yano H, Nishiura S, Tooyama S, Matsubayashi Y, Komatsu T, Park S, Okada Y, Takahashi R, Kawano Y, Hanawa T, Iwasaki K, Nozaki T, Torigoe H, Ikematsu K, Suzuki Y, Tanaka K, Martin P, Shimokawa I, Mori R. Targeting miR-223 in neutrophils enhances the clearance of *Staphylococcus aureus* in infected wounds. *EMBO Molecular Medicine*, 査読有, 10, e9024, 2018.  
DOI:10.15252/emmm.201809024
- ⑤ Mori R, Tanaka K, Shimokawa I. Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair. *Development Growth & Differentiation*, 査読有, 60, 306-315, 2018.  
DOI:10.1111/dgd.12542
- ⑥ 森 亮一、田中 克弥、野崎 中成、下川 功、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、臨床免疫・アレルギー科、査読無、69巻、46-52、2018  
DOI 無し
- ⑦ Park S, Komatsu T, Kim SE, Tanaka K, Hayashi H, Mori R, Shimokawa I. Neuropeptide Y resists excess loss of fat by lipolysis in calorie-restricted mice: a trait potential for the life-extending effect of calorie restriction. *Aging Cell*, 査読有, 16, 339-348, 2017.  
DOI:10.1111/accel.12558
- ⑧ Park S, Mori R, Shimokawa I. The fat regulator neuropeptide Y and caloric restriction. *Aging (Albany NY)*, 査読有, 30, 2243-2244, 2017.  
DOI:10.18632/aging.101338
- ⑨ Tanaka K, Kim SE, Yano H, Matsumoto G, Ohuchida R, Ishikura Y, Araki M, Araki K, Park S, Komatsu T, Hayashi H, Ikematsu K, Tanaka K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I, Mori R. MiR-142 is required for *Staphylococcus aureus* clearance at skin wound sites via small GTPase-mediated regulation of the neutrophil actin cytoskeleton. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有, 137, 931-940, 2017.  
DOI:10.1016/j.jid.2016.11.018
- ⑩ Pei W, Tanaka K, Huang SC, Xu L, Liu B, Sinclair J, Idol J, Varshney GK, Huang H, Lin S, Nussenblatt RB, Mori R, Burgess SM. Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation. *npj Regenerative Medicine*, 査読有, 1, 16013, 2016.  
DOI:10.1038/npjregenmed.2016.13

〔学会発表〕(計15件)

- ① 森 亮一、野崎 中成、miRNA-223 発現抑制は Interleukin-6 分泌促進を介し黄色ブドウ球菌感染創を改善する、第18回日本再生医療学会総会、2019
- ② 森 亮一、野崎 中成、miR-223 発現抑制は皮膚創傷部位の感染予防に効果的である、第8回臨床ゲノム医療学会、2018
- ③ 森 亮一、好中球由来 miR-223 の発現抑制は皮膚感染創における黄色ブドウ球菌排除を促進する、第41回日本分子生物学会年会、2018
- ④ Mori R、Comprehensive identification of wound healing and inflammation miRNAs reveals a key role for miR-223 in neutrophilic clearance of *S. aureus* at wound sites、EMBL Symposia The Complex Life of RNA、2018
- ⑤ 森 亮一、小松 利光、朴 盛俊、下川 功、Role of C/EBP  $\alpha$ -miR-223-Interleukin-6 secretion pathway at *Staphylococcus aureus*-infected wound sites. 第41回日本基礎老化学会総会、2018

- ⑥ 森 亮一、朴 盛俊、林 洋子、下 川功、黄色ブドウ球菌感染創における C/EBP $\alpha$ -miR-223-IL6 分泌経路の機能解析、第 107 回日本病理学会総会、2018
- ⑦ 森 亮一、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
- ⑧ Mori R、Comprehensive identification of wound healing and inflammation miRNAs reveals a key role for miR-223 in neutrophilic clearance of *S. aureus* at wound sites、33<sup>rd</sup> Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine、2017
- ⑨ 森 亮一、miR-142 は small GTPase 介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である、第 9 回日本 RNAi 研究会／第 4 回日本細胞外小胞学会、2017
- ⑩ 森 亮一、田中 克弥、小松 利光、朴 盛俊、林 洋子、荒木 正健、荒木 喜美、下川 功、Inflammation-related miR-142 family is associated with longevity and metabolism in vivo、第 40 回日本基礎老化学会総会、2017
- ⑪ Mori R、Comprehensive Identification of Wound Healing and Inflammation miRNAs Reveals a Key Role for miR-223 in Neutrophilic Clearance of *S. aureus* at Wound Sites. Gordon Research Conference: Tissue Repair and Regeneration、2017
- ⑫ 森 亮一、下川功、皮膚創傷治癒過程における miR-223 の機能解析、第 106 回日本病理学会総会、2017
- ⑬ 森 亮一、創傷治癒における microRNA の新機能。第 46 回日本創傷治癒学会、シンポジウム「創傷治癒学の最前線：基礎医学の進歩」、2016
- ⑭ 森 亮一、田中 克弥、下川 功、MiR-142 は皮膚創部における黄色ブドウ球菌感染防御に必須である、第 62 回日本病理学会秋期特別総会、2016
- ⑮ Mori R、Identification of wound inflammation-related miRNAs: miR-223-deficient neutrophils improve *Staphylococcus aureus*-infected skin wound sites. EMBO Conference: The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair、2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

無し

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：下川 功

ローマ字氏名：SHIMOKAWA, Isao

研究協力者氏名：小松 利光

ローマ字氏名：KOMATSU, Toshimitsu

研究協力者氏名：田中 克弥

ローマ字氏名：TANAKA, Katsuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。