

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20361

研究課題名(和文)炎症性 microRNA が司る皮膚創傷治癒及び生命恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of inflammation-related miRNA in skin wound healing and homeostasis

研究代表者

田中 克弥(TANAKA, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員

研究者番号：70722750

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): microRNA は、標的 mRNA に結合し蛋白質翻訳を調節する非コード RNA である。本研究では、miR-142 ノックアウト(KO)マウスを作製し、黄色ブドウ球菌感染皮膚創傷治癒が miR-142 KO マウスにおいて有意に遅延することを示した。さらに miR-142 KO 好中球は、細胞極性・走化性の変化に伴って、黄色ブドウ球菌貪食が遅延した。さらに miR-142 は、細胞骨格調節関連 small GTPase 遺伝子群の発現制御を担っていることが明らかとなった。本研究によって miR-142 は、黄色ブドウ球菌感染に対する生体防御反応に必要な不可欠であることが実証された。

研究成果の概要(英文): MicroRNAs are small noncoding RNAs that regulate protein translation by binding to complementary target mRNAs. In this study, we generated miR-142 knockout (KO) mice and showed that healing of Staphylococcus aureus-infected skin wounds was significantly delayed in miR-142 KO mice compared with that in wild-type mice. MiR-142 KO neutrophils showed altered phagocytosis as a consequence of chemotactic behavior, including enhanced F-actin assembly, disturbed cell polarity, and increased cell motility. We showed that these changes were linked to cytoskeletal regulation, and that expression of the small GTPases was markedly increased in miR-142 -/- neutrophils. Collectively, our data demonstrate that the miR-142 family is indispensable for protection against S. aureus infection and its clearance at wound sites. MiR-142-3p and miR-142-5p play nonredundant roles in actin cytoskeleton regulation by controlling small GTPase translation in neutrophils at wound sites.

研究分野：形成外科学

キーワード：miRNA 炎症 イメージング 皮膚創傷治癒 好中球 感染 黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷治癒過程は、炎症期、増殖期、成熟期で構成される生体防御反応である。炎症期では、好中球が速やかに動員され、病原体感染防御に働く。増殖期では、マクロファージが集まり、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子の分泌および壊死組織片を貪食する。分泌された生理活性物質は、線維芽細胞や血管内皮細胞に作用して、肉芽組織が形成される。同時に、表皮細胞による再上皮化が行われ、傷口が塞がれる。成熟期では、炎症細胞や筋線維芽細胞の消退、過剰に生産された細胞外基質が分解され、最終的に癒痕(傷跡)が形成される。

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ことが知られている。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炎症反応制御の欠陥が考えられる。その理由は、上述したように、創傷治癒における好中球やマクロファージなどの炎症細胞群は、組織再生において非常に重要な役割を担っているからである。病態が重症化した場合、治癒困難な難治性皮膚潰瘍を発症することがある。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*) などが創部で異常増殖する。

microRNA (miRNA) は蛋白質に翻訳されない非コード RNA である。現在、皮膚創傷治癒過程における miRNA 機能解析が盛んに行われている。特に *miR-21* は、治療標的候補として有用性も示唆されている。われわれは、次世代シーケンサーや炎症反応が惹起しない PU.1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、炎症関連 miRNA として *miR-142* ファミリー (*miR-142-3p* および *miR-142-5p*。以下 *miR-142* と記載) を同定した。

miR-142 は、肥満細胞、樹状細胞、巨核球、リンパ球の機能に関与していることが明らかとなっている。しかしながら、皮膚創傷治癒過程における *miR-142* の機能は解明されていない。そこでわれわれは、皮膚創傷治癒過程における *miR-142* 機能解析に着手するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 皮膚創傷治癒過程における *miR-142* 機能解明
- (2) *S. aureus* 感染創における *miR-142* 機能解明
- (3) *miR-142* 標的遺伝子の同定

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) *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* (1×10^8 CFU/10 μ L) を速やかに滴下し、モデル動物を作製した。

(3) 糖尿病モデルマウス

1型糖尿病モデルマウスは、ストレプトゾトシン (STZ) (10 mg/kg) を2日おきに5回投与し作製した。

(4) 生体ライブイメージング解析を用いた好中球局在解析

好中球特異的に緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を発現している *Lys-EGFP* マウスおよび *miR-142* KO マウスを交配させて *miR-142: Lys-EGFP* マウスを作製した。その後、IVIS Lumina II System (PerkinElmer) を用いて生体ライブイメージング解析を行った。

(5) 生細胞ライブイメージング解析を用いた好中球動態解析

Lys-EGFP マウスおよび *miR-142: Lys-EGFP* マウス骨髄より、MicroBead Kits (Miltenyi Biotec Inc.) を用いて好中球を分離した。その後、共焦点顕微鏡 (C2+ system, Nikon Corporation) を用いて生細胞ライブイメージング解析を行った。

(6) 超解像顕微鏡を用いたアクチン局在解析

好中球を F アクチンで染色し、超解像顕微鏡 (ELYRA PS.1, Carl Zeiss) を用いてイメージング解析を行った。

(7) *miR-142* 標的遺伝子結合解析

はじめに Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>) より *miR-142* 標的遺伝子のスクリーニングを行った。次に pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega Corp.) に標的予想配列を導入した。構築したベクターおよび *miR-142* mimic を同時に 3T3 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標として、標的遺伝子結合活性を解析した。

4. 研究成果

- (1) *MiR-142* は *S. aureus* 感染創修復に必須である。

無菌性皮膚創傷モデル、STZ 誘導 1 型糖尿病モデルならびに *S. aureus* 皮膚創部感染モデルにおける皮膚創傷治癒解析を行った (図 1)。その結果、*S. aureus* 皮膚創部感染 *miR-142* KO マウスは、再上皮化の遅延と相まって、*S. aureus* 感染した野生型 (WT) マウス (コントロール) と比べて、創傷治癒が

遅延した。一方、無菌性および1型糖尿病モデルマウスは、各コントロールマウスと比べて、治癒過程に変化を認めなかった。

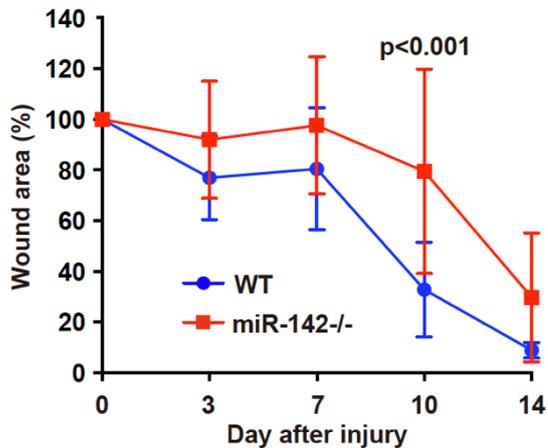


図1 *S. aureus* 感染創面積閉鎖率

受傷後3日目の創部 *S. aureus* 生菌数を調べた結果、*miR-142 KO* マウスは、コントロールマウスと比較して6.2倍もの *S. aureus* が認められた。さらに接触感染について解析するため、*S. aureus* 水平感染モデルを確立し解析したところ、*miR-142 KO* マウスは *S. aureus* 易感染を示した。以上の結果より、*miR-142* は、皮膚創部における *S. aureus* 感染防御に必須であることが明らかとなった。

(2) *MiR-142* は *S. aureus* 感染創への好中球遊走に必須である。

好中球遊走能に関する生体イメージング解析を行った。その結果、*miR-142 KO:lys-EGFP* マウスは、*S. aureus* 感染創に集積している好中球数が減少していた(図2)。この結果より、*miR-142* は皮膚創部への好中球遊走に関与していることが判明した。

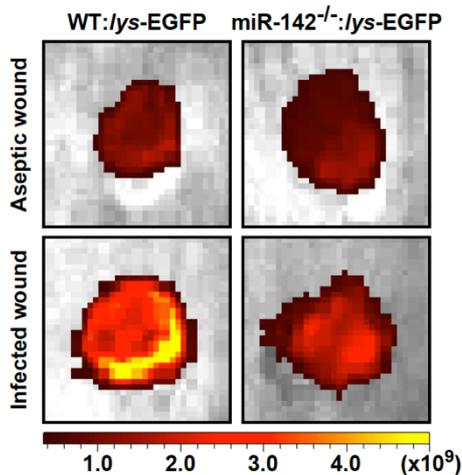


図2 創部における好中球集積の様子

(3) *MiR-142 KO* マウスは膿瘍形成が遅延する。HE染色を用いて膿瘍形成を解析した。そ

の結果、*miR-142 KO* マウスでは、膿瘍形成の際に認められる正常組織との隔絶(膿瘍膜)が認められなかった(図3)。また、膿瘍部位に集積している *miR-142 KO* 好中球は、狭長形態を呈していた。

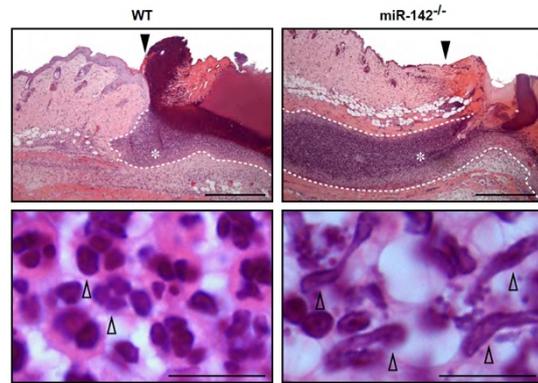


図3 膿瘍解析

(上段) 破線: 膿瘍、▼: 創縁。スケールバー: 500 μm

(下段) 上段*周囲の拡大写真。△: 好中球、スケールバー: 10 μm。

(4) *MiR-142* は *S. aureus* 食食に必須である。

創部に集積した好中球の *S. aureus* 食食能についてイメージング解析を行った。その結果、*miR-142 KO* マウスは、創部における食食空胞形成が遅延していた。

次に電子顕微鏡を用いて好中球の超微形態観察を行った。その結果 *miR-142 KO* 好中球は、創部において *S. aureus* 食食能低下が認められた。一方、食食空胞の形成には異常が認められなかった。以上の結果より、好中球における *miR-142* は、*S. aureus* 認識もしくは食食に関与していることが明らかとなった。

(5) *MiR-142* は好中球遊走における細胞極性を制御している。

生細胞ライブイメージングを用いて、リアルタイムで好中球の形態変化および走化性を解析した。WT 好中球は、進行方向に葉状仮足および糸状仮足、反対側には後方退縮を認め細胞極性が制御されていた(図4)。一方 *miR-142 KO* 好中球は、複数の先端端形成が認められ、前後左右に同時に引っ張られるように遊走し、細胞極性制御が破綻していた。その著明な形態変化と相まって、遊走速度および移動距離の増加が認められた。

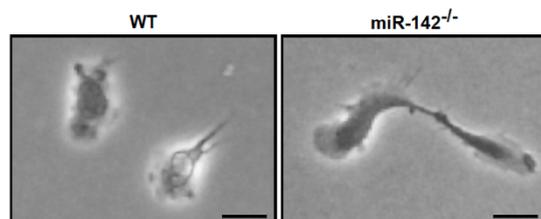


図4 走化性時における好中球形態変化。位相差顕微鏡観察。スケールバー: 10 μm。

アクチンは、細胞移動・形態維持に重要な細胞骨格形成関連蛋白質である。われわれは、細胞内の微細構造を高分解能で観察できる超解像顕微鏡を用いて、好中球走化性時におけるアクチンの構造解析を行った(図5)。正常な好中球は、進行方向に高密度にアクチンに富む先端端を認めた。一方 *miR-142* KO 好中球は、複数の先端端形成および後方退縮の消失が観察された。以上の結果をまとめると *miR-142* は、好中球の細胞極性制御に必須であることが明らかとなった。

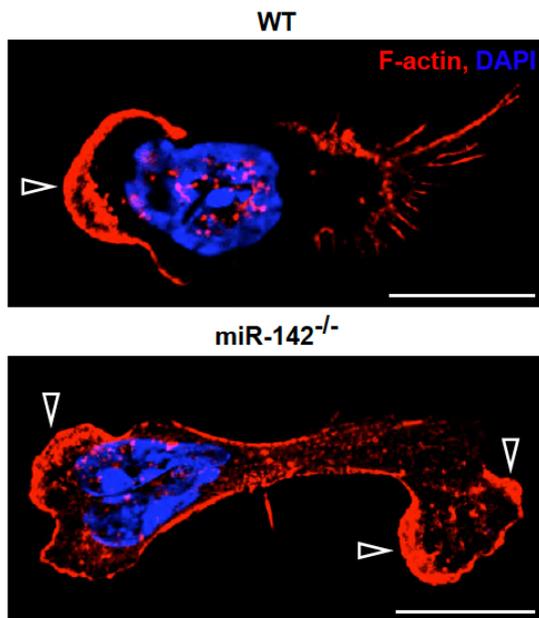


図5 超解像イメージング解析
△ : leading edge。スケールバー : 10 μm。

(6) *MiR-142* は低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac1 および RhoA 翻訳抑制を制御している。低分子量 GTP 結合蛋白質は、細胞運動制御に重要な役割を果たしている。特に Rhoファミリー GTP 結合蛋白質 (RhoA, Rac1, Cdc42) は、細胞骨格制御を担っており、RhoA はストレスファイバーや接着斑、Rac1 は葉状仮足、Cdc42 は糸状仮足形成に関与することが知られている。一方、バイオインフォマティクス解析により *RhoA*, *Rac1*, *Cdc42* は、*miR-142* の標的遺伝子候補として推察されている。蛋白質発現量を調べた結果、*miR-142* KO 活性化好中球では、活性化 WT 好中球と比較して、Rac1 および RhoA 蛋白質の上昇が認められた。次に *miR-142* と *Rac1* および *RhoA* の分子間相互作用を解析した結果、*miR-142-3p* は *Rac1*, *miR-142-5p* は *RhoA* の各々の3' 非翻訳領域に結合し、蛋白質翻訳を抑制していることが明らかとなった(図6)。

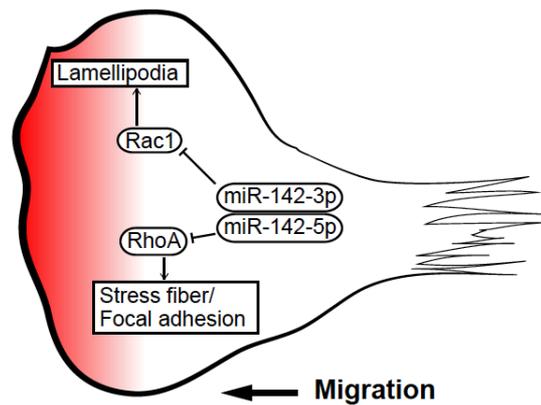


図6 好中球における *miR-142* 機能

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5件)

- ① Tanaka K, Yano H, Hayashi H, Hirano A: Total resection combined with osteotomy is more effective for orbital solitary fibrous tumor excision: a report of three cases. *International Ophthalmology*, 38, 345-351, 2018. (査読有)
- ② Tanaka K, Kim SE, Yano H, Matsumoto G, Ohuchida R, Ishikura Y, 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*, 137, 931-940, 2017. (査読有)
- ③ 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*, 16, 339-348, 2017. (査読有)
- ④ 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*, 1, 16013, 2016. (査読有)
- ⑤ Akita S, Yoshimoto H, Tanaka K, Oishi M, Senju C, Mawatari S, Takahara E, Suzuki S, Hayashida K: Silver Sulfadiazine-Impregnated Hydrocolloid Dressing Is Beneficial in Split-Thickness Skin-Graft Donor

Wound Healing in a Small Randomized Controlled Study, International Journal of Low Extremity Wounds. 15, 338-343, 2016. (査読有)

〔学会発表〕 (計2件)

- ① 田中 克弥: miR-142 は small GTPase を介して好中球の細胞骨格を調節し黄色ブドウ球菌の排除に関わっている, 第26回日本形成外科学会基礎学術集会, 2017年
- ② Mori R, Tanaka K: Comprehensively identification of inflammation related microRNA in skin wound healing using next generation sequencing, Annual Meeting for Society for Plastics and Regenerative Science, 2016年

〔図書〕 (計1件)

- ① 森 亮一, 田中 克弥, 野崎 中成, 下川 功: miR-142 は small GTPase を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改善に必須である、臨床免疫・アレルギー科, 科学評論社、69, 46-52, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克弥 (TANAKA, Katsuya)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
研究協力員
研究者番号: 70722750