

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10010

研究課題名(和文) Exosomal miRNA-21とインフラマソームの相互作用：難治性創傷での役割

研究課題名(英文) Interaction between exosomal miRNA-21 and inflammasome- role in 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、exosomal miR-21とインフラマソーム活性によるマクロファージ異常との関連性をあきらかにすることを目的とした。マクロファージ細胞と単球細胞を用いた実験により、miR-21はマクロファージをM1形質へシフトさせることがわかりました。さらにNLRP3インフラマソーム活性化にも影響を及ぼすことが明らかになった。NFkappaBの関与も確認された。また、細胞から分泌されるExosomal miR-21は周囲のマクロファージ細胞での炎症反応を引き起こし、慢性炎症に影響を及ぼすことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性難治性潰瘍は生活の質(QOL)に大きな影響を及ぼすだけでなく、時には死亡の要因となることも知られている。現在、細胞から体液中に分泌されるエクソソームmiRNA (exosomal miRNA)が細胞間情報伝達システムとして働き、炎症反応における役割や種々の疾患への関与が知られるようになってきた。しかし、糖尿病患者における難治性創傷化の要因と考えられる慢性炎症に関する細胞間情報伝達システムとしてのexosomal miRNAの意義は不明である。本研究では、難治性創傷におけるexosomal miRNA-21の役割を検討し、創傷治癒遅延についての新たな知見を得ることである。

研究成果の概要(英文)：The current research project investigated the role of exosomal miR-21 in inducing inflammation in macrophages, and the relationship with NLRP3 inflammasome. In vitro experiments employing macrophages and monocytes revealed that miR-21 overexpression results in a shift towards pro-inflammatory M1 phenotypes, with an involvement of NFkappaB and PI3K signal pathways. NFkappaB p65 was involved in establishing a direct relationship between miR-21 and NLRP3 inflammasome activation, by binding to the promoter region of NLRP3 DNA. The exosomes secreted by these cells were enriched with miR-21, and demonstrated a paracrine effect on the surrounding macrophages, creating a pro-inflammatory milieu.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：MicroRNA Exosome 創傷治癒 インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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貪食細胞(マクロファージ)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必要である。創傷治癒初期にマクロファージは炎症促進性(pro-inflammatory)の M1 形質を持ち、炎症期後半に抗炎症性(anti-inflammatory)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 α ,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 β 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 への変換が創傷環境に存在する様々な介在物資を通して行い、創傷の増殖期に向けての進展にとって重要である。しかし、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。炎症の要となるのは、炎症誘導性のサイトカインの分泌を引き起こす細胞質内蛋白質複合体インフラマソームである。インフラマソームは創傷治癒においても重要な調節経路となっており、炎症経過を決定する。過剰なインフラマソームの活性化は炎症の遷延化を来す要因となる。

マクロファージの M1 から M2 表現型への変遷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。しかし、難治性創傷に存在する炎症促進性 M1 マクロファージの持続性に関する因子がいまだ不明である。

2. 研究の目的

近年、様々な疾患の発症や進行と microRNA(miRNA)の関連性が次々と明らかになっている。MiRNA 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 miRNA が機能的な役割を持つことが明らかになってきた。これまで我々は microRNA-21(miRNA-21)が創傷治癒機転に重要であることと、糖尿病性創傷における調節が正常とは異なり、創傷治癒の炎症期に著しい発現低下が認められることを明らかにした。

最近、エクソソーム(Exosome)と呼ばれる細胞外小胞(細胞から分泌される小さな膜結合小胞)が種々の生体現象に関わっていて、様々な疾患の病態プロセスに関与していることが明らかになってきている。エクソソームは mRNA、miRNA および蛋白質などを内包していて、他の細胞へと受け渡されていることで傍分泌的な細胞間情報伝達システムとして働いていると考えられる。特に、Exosomal miRNA はエクソソームの病態生理学的役割に深く関与している。エクソソームに含まれる miRNA-21 (exosomal miRNA-21) は多様な疾患の進行又は抑制システムとして働いていることが明らかになっている(例、心血管疾患での心保護作用、癌細胞転移促進作用、など)。しかし、糖尿病性創傷を含む難治性創傷における遷延性炎症での exosomal miRNA-21 の

関連は未知である。

本研究の目的は、難治性創傷の遅延性炎症反応における exosomal microRNA-21 とインフラマソームの相互作用を解明することで、慢性炎症についての新たな知見を得るとともに、難治性創傷の新規治療法を探索することである。

3 . 研究の方法

マクロファージ細胞または単球細胞を用いての *in vitro* 実験 :

(1) LPS・ATP/nigericin などの刺激により細胞での炎症を起し、miR-21 の発現変化を Real-time PCR 法で測定し、NLRP3 インフラマソームの蛋白質である NLRP3、IL-1beta、IL-18、Caspase-1 などの発現増加と活性化を Real-time PCR、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法により測定する。

さらに、刺激を受けた細胞から分泌される exosome を採取し、無感作(ナイーブ)マクロファージ細胞へ導入して、受給細胞での炎症を確認する。

(2) マクロファージ細胞を用いて、miRNA-21 の過剰発現又は発現抑制細胞を作る。miRNA-21 遺伝子をコードしているゲノム DNA をプラスミドベクターの中に連結し、electroporation 法によりマクロファージ細胞内へ導入する。miR-21 遺伝子を過剰発現させた細胞をあらかじめプラスミドに組み込まれた特異的な抗生物質に対する耐性を利用し単離する。同じく、MiRNA-21 の拮抗物質 anti-miRNA をマクロファージ細胞へ導入し、miRNA-21 発現抑制細胞モデルを作成する。それぞれの条件での M1・M2 形質の割合を FACS 法で測定する。また、miR-21、NLRP3、IL-1beta、IL-18、Caspase-1 などの発現増加と活性化を測定する。

(3) 上記(2)で作成した細胞から分泌されるエクソソームを採取し、exosomal miRNA-21 の発現を測定する。さらに、exosomal miRNA-21 を作成し、マクロファージへ導入させて、その細胞でのインフラマソーム蛋白 (NLRP3,Caspase-1,IL-1 β ,IL-18) の発現量の変化を PCR 及びウェスタンブロット法により確認する。また、ケモタキシスアッセイ・活性酸素種 (ROS) アッセイにより exosomal miRNA-21 による炎症機構制御を調べる。

以上より、慢性炎症に関する exosomal miRNA-21 とインフラマソームの相互作用を解明するとともに、難治性創傷における炎症調節機構についての新たな知見を与え、新たな難治性創傷の治療法の開発が期待できる。

4 . 研究成果

(1) LPS・ATP などの刺激によりマクロファージまたは単球細胞での炎症を起したところ miR-21 の発現増加が見られた。FACS 法によりマクロファージ細胞の M1 形質へのシフトが確認した。更に、NLRP3 インフラマソームの蛋白質である NLRP3、IL-1beta、IL-18、Caspase-1 などの発現増加が Real-time PCR とウェスタンブロット法により分かりました。免疫組織染色法にて NLRP3 インフラマソームの活性化 (NLRP3/ASC/Caspase-1 の co-localization と

Caspase-1 の活性化)が明らかになった。刺激を受けた細胞から分泌される exosome を採取し、miR-21 発現増加を確認した。Exosome を無感作(ナイーブ)マクロファージ細胞へ導入したところ、受給細胞での M1 形質へのシフトに伴う ROS・炎症が起きた。

- (2) MiR-21 プラスミド導入により miR-21 の過剰発現させた細胞でも上記の条件と似たような結果が表れた。MiR-21 発現抑制細胞では逆の結果が見られた。MiR-21 が NFkappaB と PI3K signal pathway を通して炎症作用を持つ IL-6・TNF α ,IL-1 β の発現増加を引き起こし M1 形質へのシフトに関与している。NLRP3 インフラマソームの発現増加と活性化・活性酸素種(ROS)増加も見られた。MiR-21 により NLRP3 インフラマソーム活性化にも NFkappaB が関与していることが明らかになった。NLRP3 の DNA promoter との NFkappaB p65 の結合が miR-21 により強化されることがわかりました。

- (3) MiR-21 過剰発現された細胞から分泌された exosome のサイズと形を TEM 電子顕微鏡により確認した。Exosome に含む RNA 発現を測定したところ miR-21 発現増加が確認できた。Exosome をマクロファージへ導入させ、受給細胞でのインフラマソーム蛋白(NLRP3,Caspase-1,IL-1 β ,IL-18)の発現量の変化を PCR 及びウェスタンブロット法により測定したところインフラマソームの発現増加と活性化・活性酸素種(ROS)増加が見られた。M1 蛋白 IL-6・TNF α ,IL-1 β の発現増加と M1 形質の維持を引き起こした。MiR-21 発現抑制細胞から得た exosome が逆の結果を生み出した。つまり、ROS 低下と NLRP3 インフラマソーム活性化低下が見られた。

以上の実験結果により慢性炎症の維持に関与する miR-21・Exosomal miR-21・NFkappaB・NLRP3 インフラマソームの相互作用を確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Madhyastha Radha, Madhyastha Harishkumar, Nurrahmah Queen Intan, Purbasari Bethasiwi, Maruyama Masugi, Nakajima Yuichi	4. 巻 44
2. 論文標題 MicroRNA 21 Elicits a Pro-inflammatory Response in Macrophages, with Exosomes Functioning as Delivery Vehicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 811 - 823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-021-01415-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Radha Madhyastha
2. 発表標題 Pro-inflammatory profile of miR-21 primed exosomes
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------