

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09854

研究課題名(和文) 増殖因子受容体を標的するmicroRNAを用いた皮膚瘢痕抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of skin fibrosis suppression mechanism by miRNA targeting

研究代表者

藤澤 千恵 (Fujisawa, Chie)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10393000

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)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) は皮膚創傷部の線維化を抑制する。bFGFにより誘導されたmicroRNA (miRNA)146b-5pはラット皮膚創傷部でPlatelet-derived growth factor receptor (PDGFR) の発現を低下させ、線維化関連因子の発現を低下させた。miRNA146b-5pKOラット皮膚創部にbFGFを添加すると治癒過程におけるI型、III型コラーゲンおよび血管新生への影響が認められた。これらの結果からmiRNA146b-5pが過剰な瘢痕形成を予防するのに有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚創傷の治癒過程において、組織の過度の線維化により引きつれなどから起こる機能障害を伴う過度の瘢痕が形成されることがある。本研究では、SDラットおよびmiRNA146b欠損ラットを用いて、創傷治癒過程でbFGFにより誘導されたmicro RNA146b-5pが線維化を抑制することを明らかにした。今後、micro RNA146b-5pによる線維化抑制の機序を解明することで患者のQOLを低下させる過度の瘢痕形成に対する新しい予防法を確立することができる。

研究成果の概要(英文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) suppresses fibrosis in skin wounds. microRNA (miRNA) 146b-5p induced by bFGF decreased the expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and fibrosis-related factors in the skin wound area of SD rats. When bFGF was added to the skin wounds of miRNA146b-5pKO rats, effects on type I and type III collagen and angiogenesis during the wound healing process were observed. These results suggest that miRNA146b-5p, which controls the expression of PDGFR, is effective in preventing excessive scarring.

研究分野：実験動物

キーワード：創傷治癒 micro RNA bFGF KOラット

1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷は止血期、炎症期、線維増殖期、成熟期を経て治癒する。炎症期には炎症細胞や血管内皮細胞が遊走し、Platelet derived growth factor(PDGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)を含む増殖因子を分泌し、線維芽細胞の遊走、増殖を促す。増殖した線維芽細胞はコラーゲンを産生する筋線維芽細胞へと分化し、癒痕を形成する。この過程で、何らかの要因により線維芽細胞が過剰に増殖した結果、過度の癒痕(癒痕拘縮)が形成されることがある。癒痕拘縮は引きつれなどから起こる機能障害を伴うことから患者のQOLを低下させるため、線維芽細胞の過剰な増殖を抑制することは癒痕拘縮の予防に重要である。

我々は、ラットの皮膚創部に bFGF を投与すると治癒過程の後期に線維芽細胞の組織線維化機能が低下し、癒痕形成を抑制することを明らかにしている。近年、線維化に遺伝子の発現を抑制する microRNA (miRNA) が関与していることが報告されている(O' Reilly S. Arthritis Research & Therapy 2016)。皮膚創傷の線維化にも miRNA の関与が想定されているが、創傷治癒過程では様々な因子が関与するため、線維化を制御する miRNA とその標的 mRNA については未だ明らかになっていない。そこで bFGF で刺激した培養線維芽細胞の miRNA 発現について miRNA マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。その結果、bFGF の刺激により発現が増加する miRNA として miRNA146b-5p (miRNA146b) が確認されたことから、癒痕形成を制御する miRNA 候補として選定した。この miRNA146b について PDGFR α mRNA を標的としてその発現が低下させることでコラーゲン発現低下が生じることを *in vitro* で証明した。しかしながら、生体内で miRNA146b が PDGFR α を標的にしてその発現を制御するかどうかについては明らかとなっていない。そこで、*in vitro* において線維芽細胞の線維化を制御する miRNA146b が生体内において癒痕の形成過程にどのような役割を果たしているかを検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro* で明らかにした bFGF により誘導された miRNA146b が線維化を抑制する作用について、*in vivo* においても同様に miRNA146b が PDGFR α を標的として癒痕の形成を抑制するかを検証することである。その目的のため、SD ラットおよび miRNA146bKO ラットを用いて皮膚創傷の癒痕形成における miRNA146b の機能を明らかにする。miRNA146b を欠損することで線維化が癒痕の形成過程でどのように変化するかを検討するほか、PDGFR α 陽性間葉系幹細胞が線維芽細胞へと分化する際の miRNA146b の関与についても検討する。これらの実験により生体内の間葉系幹細胞による癒痕形成の機序とその際の miRNA146b の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚創傷における miRNA146b の影響

皮膚創傷モデルの作成

SD ラット背部の皮膚に 8mm バイオプシーパンチにて全層欠損潰瘍を作成する。創傷作成後経時的に肉芽組織を採取、解析を行う。

皮膚創部における線維化の検討

創傷治癒過程における miRNA146b の線維化への影響について組織学的検討を行う。SD ラット皮膚創部に miRNA146b mimic および miRNA146b inhibitor を投与した後、経時的に創部の採取を行う。創部の組織切片における創部面積およびマロリーアザン染色を用いた線維化の比較検討を行う。

線維化関連因子の発現解析

創傷治癒過程において miRNA146b がどのような線維化関連因子に関連しているかについて比較検討を行う。創傷部へ miRNA146b mimic および miRNA146b inhibitor を投与し、線維化関連因子の発現量の変化について real time PCR で解析する。

(2) miRNA146b 欠損による皮膚創傷の癒痕および線維化への影響

創傷治癒過程における組織学的解析

miRNA146bKO ラットと野生型ラットの背部皮膚に 6mm バイオプシーパンチにて全層欠損創傷を作製し、癒痕形成を比較する。

bFGF 投与および組織学的解析

皮膚創部に bFGF 含有ポロキサマーP407/P188 ゲルを投与し、経時的に皮膚創部の採取を行う。創部の組織切片について組織学的な観察およびマーカー分子の免疫組織化学的な解析を行う。マーカー分子として血管内皮マーカー (RECA-1)、Ki67、PDGFR α 、コラーゲン type I と III の発現を検討する。

4. 研究成果

(1) 皮膚創傷における miRNA146b の影響

miRNA146b は皮膚線維芽細胞において bFGF により誘導され、PDGFR α を標的としてその発

現を抑制し、癬痕線維化を抑制することを明らかにしている。今回、*in vivo* において miRNA146b が創傷治癒にどのように影響を与えるか miRNA146b mimic を SD ラット皮膚創部に投与し、検討を行った。開放創部の面積は miRNA146b mimic を投与することで有意な減少が認められた (Fig1)。また、創傷部の癬痕線維化は miRNA146b mimic 投与により減少が認められた。さらに皮膚創部に miRNA146b inhibitor を投与するとコントロールに比べ癬痕線維化の増加が認められた。これらの結果は、miRNA146b が創部の閉鎖を促進するとともに、癬痕線維化を抑制していると考えられた。

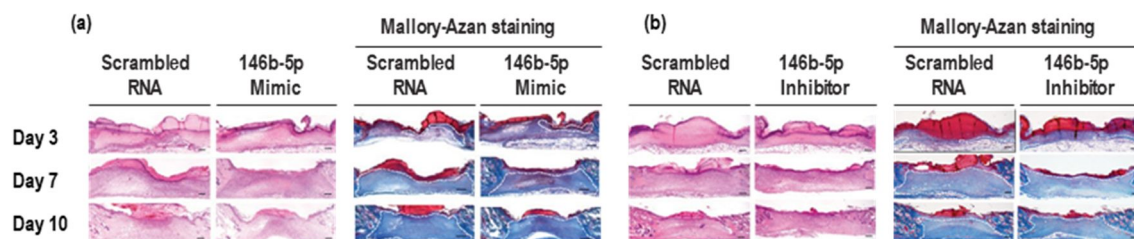


Fig 1. SDラット皮膚創部にmiRNA146bmimic(a)およびmiRNA146b inhibitor(b)を投与し、miRNA146b mimic投与により創部閉鎖の促進および線維化の抑制が認められた。miRNA146b inhibitor投与により創傷部線維化の増加が認められた。

ラット皮膚創部において miRNA146b による癬痕線維化が認められたことから線維化関連因子の発現について real time PCR で確認を行った (Fig 2)。

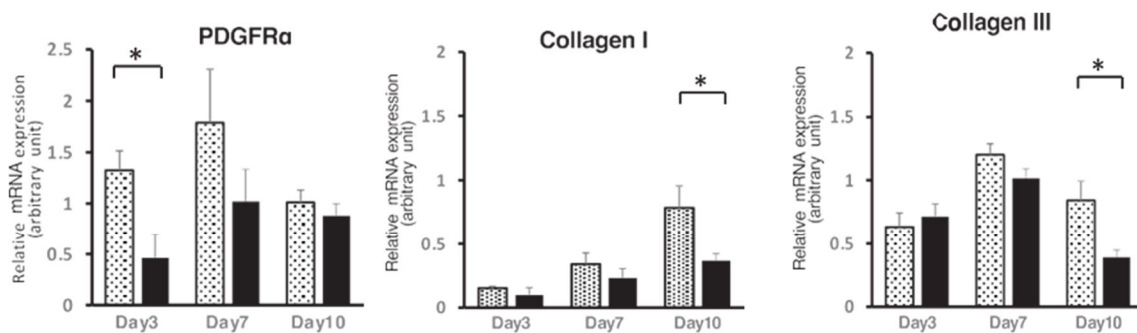


Fig2. SDラット皮膚創部にmiRNA146bmimic投与後の線維化関連因子mRNA発現。創傷後3日目にPDGFRαの減少が認められた。創傷後10日目にはCollagenIおよびIIIの減少が認められた。

miRNA146b mimic 投与群において創傷後 3 日目に PDGFRα mRNA の減少が確認された。その後、10 日目では collagen I および III mRNA の減少が認められた。このことから miRNA146b は PDGFRα を標的としてその発現を抑制することにより collagen I および III の発現を低下させ、創部の癬痕化を抑制していると考えられた。また、miRNA146b mimic を投与した皮膚創部において脂肪組織の線維芽細胞に CD81 陽性 Exosome と miRNA146b-5p の共発現が確認された。

(2) miRNA146b 欠損による皮膚創傷の癬痕および線維化への影響

SD ラット皮膚創傷治癒において miRNA146b mimic を投与することで PDGFRα の発現が抑制され、線維化関連因子である collagen I および III の発現低下と癬痕化抑制が確認されたことから miRNA146bKO ラットを用いて創傷治癒過程における癬痕化について検討を行った。皮膚の全層欠損後 4、7、10 日目における組織学的解析を行った結果、炎症期における組織学的な違いは認められなかったが増殖期および癬痕形成期において血管、膠原繊維に違いが認められた。

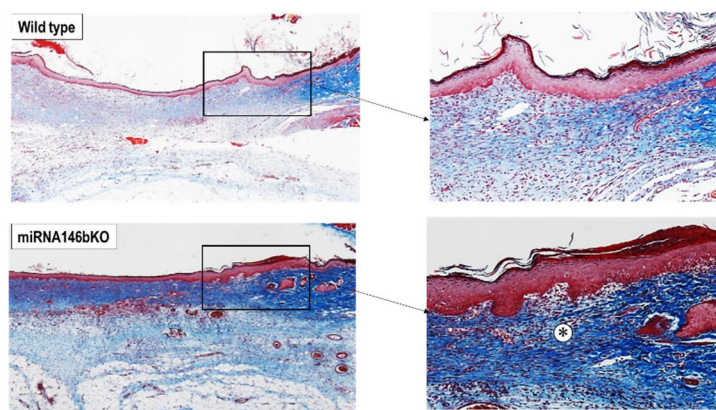


Fig 3. 創傷時にbFGF投与を行った10日後の肉芽組織像 *miRNA146bKOラット組織でコラーゲン産生および強い癬痕形成が認められる

皮膚由来の培養線維芽細胞に bFGF を添加すると miRNA146b の発現が上がり PDGFRα の発現が抑制されることから、皮膚創傷部に bFGF 含有ポロキサマーP407/P188 ゲルを投与し、創傷治癒過程の比較検討を行った。bFGF を創傷部に投与すると癬痕化が抑制されることが明ら

かとなっているが、miRNA146bKO ラットに bFGF を投与した結果、創傷部の肉芽組織においてコラーゲン産生と強い癒痕形成が確認された (Fig3)。

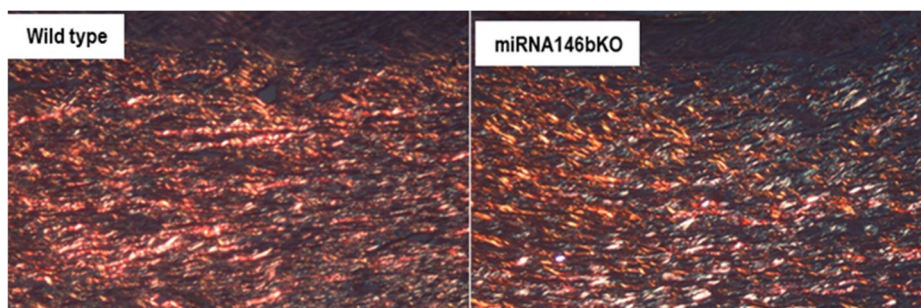


Fig4. 創傷時にbFGF投与を行った10日後のSirius Red染色像
miRNA146bKOラットではcollagenIII (白) が多くみられた

創傷部肉芽組織を sirius red 染色後偏光顕微鏡で確認した結果、Wild type ラットに比べ miRNA146bKO ラットでは白く光る collagen III が多く認められた。また、Wild type ラットはコラーゲンの規則的な走行が見られたが miRNA146bKO ラットでは走行にばらつきあるとともに太く短いコラーゲンの塊が多く認められた (Fig 4)。

以上の結果から、皮膚創傷部において miRNA146b は PDGFR α の発現を制御することにより過剰なコラーゲン産生を抑制すると考えられた。また、miRNA146bKO ラットにおいて Ki67 陽性血管内皮細胞が多く認められ、collagen III が継続的に発現していたことから線維芽細胞の増殖、活性化が起こっていると考えられる。PDGFR α は脂肪前駆細胞に発現していることが知られているが、近年マウス皮膚創部における脂肪細胞由来の細胞が筋線維芽細胞に分化して線維化を促進することが報告されている (Shook BA, et al. Stem Cell. 2020)。これらのことから miRNA146b は、線維芽細胞および脂肪前駆細胞において発現する PDGFR α の発現を制御し、それらの細胞が筋線維芽細胞への分化を抑制することで過剰なコラーゲン産生による過度の線維化を防ぎ、皮膚創部の癒痕形成を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujisawa Chie, Hamanoue Makoto, Kawano Yayoi, Murata Daiki, Akishima-Fukasawa Yuri, Okaneya Tetsuya, Minematsu Takeo, Sanada Hiromi, Tsuburaya Kayo, Isshiki Takuma, Mikami Tetsuo, Hanawa Takehisa, Akasaka Yoshikiyo	4. 巻 142
2. 論文標題 The Role for miR-146b-5p in the Attenuation of Dermal Fibrosis and Angiogenesis by Targeting PDGFR in Skin Wounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1990 ~ 2002.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.11.037	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujisawa Chie, Kodama Hiroko, Sato Yasuhiro, Mimaki Masakazu, Yagi Mariko, Awano Hiroyuki, Matsuo Muneaki, Shintaku Haruo, Yoshida Sayaka, Takayanagi Masaki, Kubota Mitsuru, Takahashi Akihito, Akasaka Yoshikiyo	4. 巻 31
2. 論文標題 Early clinical signs and treatment of Menkes disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 100849 ~ 100849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2022.100849	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤坂 喜清, 藤澤 千恵, 岡根谷 哲哉, 深澤 由里, 金田 幸枝, 本間 尚子, 荻野 晶弘, 三上 哲夫
2. 発表標題 増殖因子受容体を標的化するmicroRNA146b-5pによる癒痕抑制能の解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	林 明照 (Hayashi Akiteru) (30218557)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	
研究分担者	赤坂 喜清 (Akasaka Yoshikiyo) (60202511)	東邦大学・医学部・非常勤研究生 (32661)	
研究分担者	深澤 由里 (Fukasawa Yuri) (90392331)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	

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