

機関番号：17601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791748

研究課題名(和文) 創傷治癒過程に關与する miRNA の動態とその意義：糖尿病モデル動物を用いた研究

研究課題名(英文) Studying the significance of miRNA in diabetic wound healing using diabetic animal models

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

研究成果の概要(和文): 本研究では、マイクロ RNA と創傷治癒機転との関連に知見を与え、当該マイクロ RNA の糖尿病性創傷治癒不全における意義を考察することにある。糖尿病性創傷治癒モデルマウスを用いて糖尿病性創傷治癒の各時期において様々なマイクロ RNA の発現が亢進あるいは抑制された。それらの内 miR-21 発現が特異であった。miR-21 は線維芽細胞増殖能、ケラチン細胞増殖能に關与しなかったが、線維芽細胞遊走能、ケラチン細胞遊走能に關与した。

研究成果の概要(英文): This project aimed to investigate the role of microRNAs in diabetic related impaired wound healing. Employing diabetic mouse models, we found that several microRNAs were dysregulated during the period of wound healing. The most significant down-regulation was exhibited by miR-21. Cell culture studies revealed that miR-21 was associated with the migration of fibroblasts and keratinocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病における重要な合併症のひとつとして、創傷治癒機転の異常が挙げられる。糖尿病性皮膚潰瘍は、正常の治癒機転が働かず難治性であることはよく知られている。細胞レベルで見ると、線維芽細胞、血管内皮細胞、ケラチン細胞の増殖不全、コラーゲンの合成低下、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、各種成長因子の発現低下が観察されている。

これらの成長因子の発現異常は直接に糖尿病性創傷治癒機転異常に關与していると報告されている。しかし、様々な成長因子を臨床における創傷治癒促進に使用する試みはそれほど成果を得ていない。これらの成長因子そのものを用いた治療の難しさは、局所投与の難しさ、蛋白分解酵素が豊富に存在する創傷部位では速やかに分解されてしまう成長因子の不安定性にあると考えられている。したがって、様々な成長因子を合成し局

所投与を試みるよりも、内因性の成長因子等の発現をコントロールの方が有効性において優れていると考えられる。そのような成長因子発現調節の手段の一つとしてマイクロ RNA(miRNA)の利用が挙げられる。

(2) マイクロ RNA は近年注目されてきた小さな RNA 断片の一群で、様々な蛋白質発現を転写後調節によって制御している。実際に、マイクロ RNA が成長、発達、増殖、分化、血管新生、アポトーシスなどの広範囲の生命現象に関わっている証拠が積み上げられてきている。このようなマイクロ RNA が創傷治癒機転に深く関わっていることは容易に想像できるが、その理由としては、

- a) ダイサーと呼ばれるマイクロ RNA プロセッシング酵素をノックアウトしたマウスでは創傷治癒の不全が観察された、
- b) 血管内皮細胞の機能および血管新生を制御するいくつかのマイクロ RNA が同定されている、
- c) 線維芽細胞の増殖を制御するマイクロ RNA がいくつか同定されている、等である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、創傷治癒機序に関わっているマイクロ RNA を抽出し、更にこれらのマイクロ RNA の発現が、糖尿病で認められる創傷治癒機転の異常にどのように関与しているかを検討することにある。
- (2) 正常マウスと糖尿病発症モデルマウスにおける創傷治癒過程での当該マイクロ RNA の動態を観察することにより、当該マイクロ RNA の糖尿病性創傷治癒不全における意義を考察する。
- (3) 本研究により、マイクロ RNA および各種成長因子と創傷治癒機転との関連に知見を与え、糖尿病患者の創傷治癒改善を目指して次に予定されるべき糖尿病発症モデルマウスを用いたマイクロ RNA 発現調節による創傷治癒介入実験への基礎的データが得られると期待している。

3. 研究の方法

殆どのマイクロ RNA がマウスおよびヒトで共通であると考えられていることから、マウスを用いた創傷治癒モデルを用いてマイクロ RNA の変化を検討する。

(1) KKAY マウスを糖尿病性創傷治癒モデルとして用いてマイクロ RNA の発現を検討する。

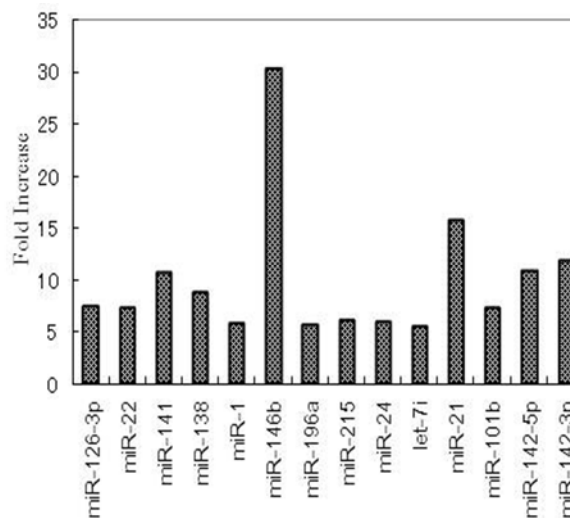
PCR array により、細胞分化と発生に關与する 88 種類のマイクロ RNA の発現を正常マウス皮膚と比較する。

(2) 正常マウス皮膚と KKAY マウス皮膚に皮膚生検用パンチを用いて創傷を作製し、経時的に創傷周辺組織を採取する。創傷を作製していない正常マウス皮膚をコントロールとして用いる。採取した組織からマイクロ RNA を豊富に含む総 RNA を抽出し、PCR アレイ法を用いて、網羅的にマイクロ RNA の発現プロファイルを得る。この方法により、創傷治癒の各時期において発現が亢進あるいは抑制されているマイクロ RNA が判別される。

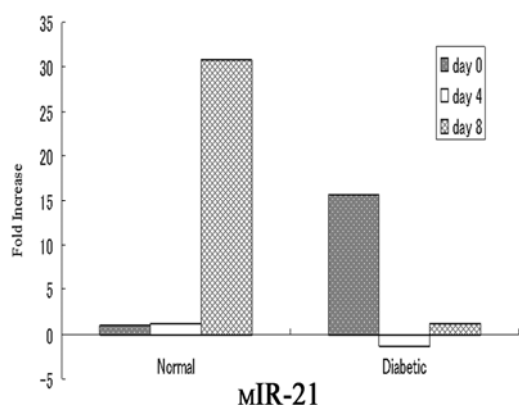
(3) 正常マウスあるいは KKAY マウスの皮膚組織から線維芽細胞、ケラチン細胞等を FACS 法を用いて単離し、創傷治癒促進マイクロ RNA の前駆物質あるいはアンタゴニストを transfect させ、細胞増殖能、細胞遊走能を検討する。マイクロ RNA の前駆物質あるいは、アンタゴニストを利用することにより、人為的にこれらのマイクロ RNA の培養細胞における発現をコントロールすることが可能になる。このように、当該マイクロ RNA 過剰発現および発現抑制細胞モデルを作成する。これらの細胞を使用して、すでに確立された方法で細胞増殖能、細胞遊走能を検討する。この実験により、創傷治癒促進マイクロ RNA が創傷治癒に關係するこれらの細胞の機能に与える影響が確認できる。

4. 研究成果

(1) KKAY マウス皮膚を正常マウス皮膚と比較した結果 88 種類の内 14 種類マイクロ RNA の発現が KKAY マウス皮膚で 10 倍以上増加されていた。



(2) 正常マウス皮膚と KKAY マウス皮膚に創傷を作製し、経時的に(0日後、4日後および8日後)創傷周辺組織を採取し、マイクロ RNA の発現を解析した。PCR array 法により、糖尿病性創傷治癒の各時期において発現が亢進あるいは抑制されているマイクロ RNA が判別された。様々なマイクロ RNA の発現が促進あるいは抑制されていた。それらの内 miR-21 発現が特異であった。miR-21 の発現は KKAY マウス皮膚で 15 倍以上増加していたが、創傷治癒時期正常創傷より 25 倍以上減少されていた。



miR-21 が細胞増殖、細胞遊走等に重要な役割を持っていると言われているから、次の実験は miR-21 に注目しておこなった。

(3) 正常マウスあるいは KKAY マウスの皮膚組織から線維芽細胞、ケラチン細胞等を FACS 法を用いて単離した。miR-21 の前駆物質あるいは、アンタゴニストを transfect することにより、miR-21 過剰発現および発現抑制細胞モデルを作成した。これらの細胞を使用して、miR-21 による線維芽細胞増殖能、ケラチン細胞増殖能、線維芽細胞遊走能、ケラチン細胞遊走能への影響を検討した。結果、miR-21 は線維芽細胞増殖能、ケラチン細胞増殖能に関与しなかったが、線維芽細胞遊走能、ケラチン細胞遊走能に関与した。miR-21 過剰発現細胞で遊走促進、miR-21 発現抑制細胞で遊走抑制が見られた。このことにより、創傷治癒期間における細胞遊走能に miR-21 が重要であることがわかった。

今後、miR-21 による糖尿病性創傷治癒に与える影響を詳しく検討する予定である。

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0件)

[学会発表](計2件)

(1) マドゥエスタ ラダ, マドゥエスタ ハリシャクマール, 中島雄一, 大村さゆり, 丸山眞杉, Dysregulation of urokinase plasminogen activator system during diabetic wound healing, International Society of Fibrinolysis and Proteolysis, August 24-28, 2010, Amsterdam, The Netherlands

(2) マドゥエスタ ハリシャクマール, マドゥエスタ ラダ, ドンガナ サンドラ, 中島雄一, 大村さゆり, 丸山眞杉, Growth factors fluctuations during collagen-phycoyanin scaffold application in dermal wound healing, 87 回日本生理学会 5 月 19 - 21, 2010, 盛岡

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：