

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20314

研究課題名(和文) 糖尿病性創傷の好中球分子メカニズム解明および炎症制御に資するリード化合物の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of diabetic-derived neutrophils and exploration of lead compound that contribute to inflammation regulation

研究代表者

梅原 敬弘 (UMEHARA, Takahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：60617421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DM性皮膚創傷部における好中球集積は異常であり、炎症が長期化するため、治癒遅延の要因としてDM由来好中球が炎症制御に関与する機能異常を生じた可能性を示唆している。MicroRNA(miRNA)は、炎症過程における重要な制御分子であるが、DM由来好中球におけるmiRNAの同定は未だ行われていない。本研究では、マイクロアレイを用いて、DM由来好中球特異的に発現誘導されるmiRNAを網羅的に同定し、分子生物学的手法を用いて、炎症関連miRNAとそれらが発現制御する遺伝子の機能解明及び同定を行った。本研究により、miRNAが司るDM由来好中球の炎症制御機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is known to delay the healing of wounds and cause complications such as foot ulcers. We have previously shown that the retention of neutrophils in diabetic cutaneous wounds is aberrant in mice, inflammation is prolonged, and the pathogenesis may be due to dysfunction of diabetes-derived neutrophils. MicroRNAs(miRNAs) are critical regulator for normal inflammatory response. Accordingly, in order to clarify the molecular mechanism of regulation of inflammation in diabetes-derived neutrophils, we identified specific miRNAs in these cells using microarrays and analyzed the function of miRNAs in diabetes-derived neutrophils. In this study, we identified specific miRNA in neutrophil of type 2 diabetes mouse using microarray, and clarified a part of functions of inflammation-related miRNA and its target genes using cellular and molecular biological.

研究分野：法医学

キーワード：糖尿病性創傷 炎症制御 microRNA

1. 研究開始当初の背景

糖尿病 (DM) 患者の創傷治癒は遅延し、難治性皮膚潰瘍になることが知られている。DM マウスにおいて好中球を枯渇させることで創傷部での再上皮化障害が緩和されたため、糖尿病性創傷治癒遅延への好中球の関与が示唆された (*Dovi JV et al. J Leukoc Biol. 2003*)。

外傷による炎症過程において、最初に創傷部に動員される骨髄由来好中球動態について以下のことが明らかである。(1) 非 DM マウスでは炎症ピークである創傷後 3 日までに創傷部に徐々に集積し、血管新生期である創傷後 7 日目には創傷後 2 日と同程度まで減少した。しかし、DM マウスでは創傷後 2 日で急激に集積し、創傷後 7 日目においてもなお創傷後 2 日と同程度に集積していた (*Elahe M, Mace KA. Blood, 2011*)。(2) DM マウス創傷部に好中球が集積する原因を探るべく、好中球特異的に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する DM マウスと赤色蛍光蛋白質 (RFP) を発現する非 DM マウスから好中球を分離し、DM・非 DM レシピエントマウス (GFP 及び RFP 非発現マウス) それぞれの創傷部に移植、創傷後 3 日における好中球の集積を検討した。驚くべきことに、DM・非 DM マウスに関わらず、それぞれの創傷部では、非 DM マウス由来の正常な好中球ではなく、選択的に DM マウス由来の好中球を集積させた。これらの結果は、創傷治癒遅延の要因として炎症の長期化、またその本態としての DM 由来好中球が、炎症制御に関与する機能異常を生じた可能性を示唆している。

microRNA (miRNA) は mRNA の翻訳抑制や分解を行い、タンパク質合成を阻害する非コード RNA であり、分子標的治療薬などの新規治療薬開発への有用性が非常に高いことで注目されている。DM の創傷治癒過程においては、創傷皮膚組織で発現する miRNA の治癒遅延への関与が報告されている (*Wang JM et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014*)。一方で、前記するように (*Dovi JV*)、糖尿病性創傷治癒遅延への好中球の関与が認められ、創傷治癒過程における炎症制御への miRNA の関与が推察されるが、DM 由来好中球制御に関与する miRNA は未だ同定すら行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性皮膚創傷治癒遅延に関与する DM 由来好中球制御の分子メカニズム解明のため、DM 由来の好中球特異的に発現する miRNA を同定し、包括的に解析することである。

3. 研究の方法

(1) DM モデルマウスの作製

DM モデルマウスは、雌雄共に繁殖能力を保持していない。そのため、系統維持については db/+m マウス (いわゆるヘテロマウス) の交配によって行う。

(2) 好中球の分離

DM マウスの下肢骨より 27 ゲージ針を用いて、骨髄を PBS で洗い出し、19 ゲージ針を用いて懸濁する。その後、Neutrophil isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて骨髄より好中球を分離した。

(3) 免疫沈降法による miRNA の精製

骨髄より分離した好中球から、抗 Argonaute2 (Ago2) 抗体 (Wako) を用いた免疫沈降法により、成熟 miRNA (Ago2-miRNA 複合体) の精製を行った。

(4) マイクロアレイを用いた miRNA 同定

マイクロアレイは、SurePrint G3 Mouse miRNA microarray (Agilent Technologies) を用いて行った。解析には GeneSpring v13 (Agilent Technologies) を用いた。

(5) quantitative real-time PCR (qRT-PCR) による miRNA・mRNA 発現動態解析

Total RNA 及び miRNA は、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Prime-Script® RT Reagent Kit (Takara) 及び miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (EXICON) を用いて cDNA 合成を行ったのち、SYBR Green I 法にて miRNA・mRNA の定量を行った。

(6) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

miRNA の標的遺伝子への制御を確認するために、ルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。標的遺伝子の DNA 合成は北海道システムサイエンスに委託し、miR mimic は EXICON より購入した。レポータープラスミドと mimic は Lipofectamine3000 (Invitrogen) により 3T3 細胞にトランスフェクションした。48 時間後、dual luciferase reporter assay kit (Promega) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイを用いた DM 由来好中球における miRNA 発現動態解析

標的 mRNA 発現を制御する miRNA のみを精製するために、抗 Ago2 抗体を用いた免疫沈降法により成熟 miRNA を精製したのち、マイクロアレイ法を用いて、DM 由来好中球特異的に発現する miRNA を同定した。その結果、DM 由来好中球において 100 種類以上の miRNA が特異的に発現誘導されていることが明らかとなった (図 1)。

Gene symbol	Fold difference (Db/Non-db)	Regulation
mmu-miR-144-3p	2.6	up
mmu-miR-223-3p	2.1	up
mmu-miR-129-2-3p	3.2	down
mmu-miR-149-3p	2.7	down

図1 マイクロアレイを用いたDM由来好中球特異的なmiRNA

(2) DM 由来好中球における microRNA-129 (miR-129) family 発現動態解析

DM 由来好中球において非 DM 由来好中球と比較して 3 倍以上の発現変動を示した miR-129 family に着目し、microRNA LNA™ PCR primer sets を用いて、詳細な発現検討を RT-qPCR を用いて行ったところ、DM 由来好中球において有意な発現減少を認めた (図 2)。

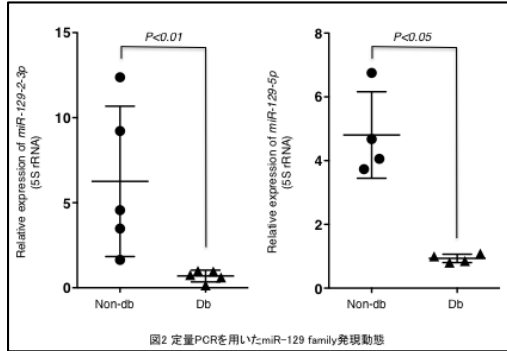


図2 定量PCRを用いたmiR-129 family発現動態

(3) miRNA 標的遺伝子群の同定

DM 由来好中球特異的に発現する miR-129 を始めとする miRNA について、バイオインフォマティクス解析を行ったところ、800 種類以上の mRNA が miRNA の標的遺伝子候補として予測された。それらの遺伝子に対し Gene ontology・パスウェイ解析を行ったところ、炎症反応やアポトーシスなどの biological process に関与することが明らかとなった (図 3)。

Gene symbol	Gene name
Inflammatory response	
<i>Hyal3</i>	Hyaluronoglucosaminidase 3
<i>Casp6</i>	Caspase 6
<i>Ccr11</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1
<i>Ccr2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2
<i>Havcr2</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 2
<i>Myd88</i>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<i>Cxcl5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
<i>Il23r</i>	Interleukin 23 receptor
<i>Tlr5</i>	Toll-like receptor 5
<i>Ccl24</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 24
<i>Pycard</i>	PYD and CARD domain containing
<i>Vimp</i>	VCP-interacting membrane protein
<i>Lgals9</i>	Lectin, galactose binding, soluble 9
<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
<i>Metrn1</i>	Meteorin, glial cell differentiation regulator-like
<i>Stat5a</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A
Execution phase of apoptosis	
<i>Casp8</i>	Caspase 8
<i>Taok1</i>	TAO kinase 1
<i>Dedd2</i>	Death effector domain-containing DNA binding protein 2

図3 GeneSpringを用いたGO解析

また、詳細な発現検討を RT-qPCR を用いて行

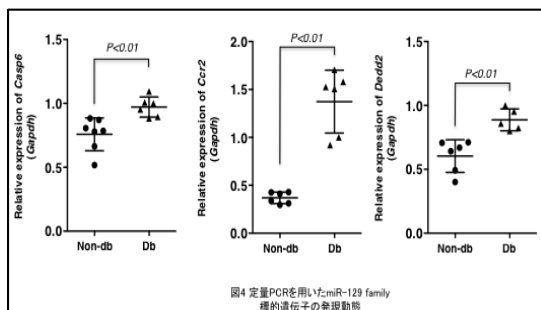


図4 定量PCRを用いたmiR-129 family 標的遺伝子の発現動態

ったところ、DM 由来好中球において複数の遺伝子の発現が増加し、それらの遺伝子発現を制御する miR とは逆の発現動態を示した (図 4)。

(4) miRNA による遺伝子発現制御機構

miR-129 の標的遺伝子と予測された遺伝子群において、実際の制御関係を検討するために、3T3 細胞に miR-129 mimic とレポータープラスミドをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、miR-129 mimic は標的遺伝子の発現を効果的に抑制していることを明らかにした (図 5)。

このことは、miR-129 が DM 由来好中球の機能異常に関与し、炎症の長期化や好中球の集積は、miR-129 が標的とする遺伝子群によって惹起された可能性があることを示唆した。

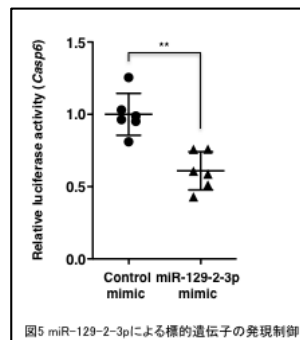


図5 miR-129-2-3pによる標的遺伝子の発現制御

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1件)

Wicks K, Torbica T, Umehara T, Amin S, Bobola N, Mace KA: Diabetes inhibits Gr-1⁺ myeloid cell maturation via cebpa deregulation. *Diabetes*, 64(12), 4184-97, 2015. (査読有)

[学会発表](計2件)

Umehara T, Yamamoto T, Murase T, Abe Y, Mace KA: Identification of specific microRNAs in diabetic-derived neutrophils, EMBO conference -The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair, 17-21 September, 2016, Paestum, Italy.

梅原 敬弘、山本 琢磨、村瀬 壮彦、安倍 優樹、Kimberly Mace、池松 和哉：糖尿病由来好中球の炎症制御に関与する microRNA 発現動態、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[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

梅原 敬弘 (UMEHARA, Takahiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教
研究者番号：60617421

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

池松 和哉 (IKEMATSU, Kazuya)
森 亮一 (MORI, Ryoichi)
キンバリー メイス (KIMBERLY, Mace)