

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11555

研究課題名(和文) bFGF誘導性の癒痕抑制性microRNAの探索と標的核酸治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文) Research on bFGF-induced microRNA which inhibit the scarring, and basic research of development of targeted nucleic acid therapy

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) 3,500,000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。今回探索されたmicroRNA (miRNA)146b-5pはbFGFにより皮膚創傷部で誘導され、標的であるPlatelet-derived growth factor receptor (PDGFR)の発現を低下させた。また、創傷部にbFGFを投与すると間葉系幹細胞を含むmiR146b-5p+/Sca-1+細胞の増加とPDGFR +/Sca-1+細胞の減少を認めた。miRNA146b-5pは間葉系細胞の増殖を促進するPDGFRの発現制御から癒痕形成の予防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

皮膚創傷における線維芽細胞の過剰な増殖は過度の癒痕を形成し、拘縮による機能障害から患者のQOL低下を招く。その対症療法はあるが、過度な癒痕形成を標的分子の発現制御から予防する方法は確立されていない。本研究において、皮膚創傷時におけるbFGFは創傷部の線維化を抑制するとともにmiRNA146b-5pを誘導することを示した。誘導されたmiRNA146b-5pはPDGFRの発現を低下させ、PDGFR陽性の間葉系幹細胞を含む幼弱な細胞から線維芽細胞への分化を制御する可能性を示唆した。この成果はin vivoにおける癒痕形成抑制および生体の過剰な線維化を伴う疾患に対する予防方法の確立に有用である。

研究成果の概要(英文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) suppresses fibrosis of skin scars. In cultured fibroblasts and skin wounds, bFGF induced microRNA (miRNA) 146b-5p and decreased the expression of its target mRNA, Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). In addition, it was revealed that by administering bFGF to the wound site, miR146b-5p+/Sca-1+ cells containing mesenchymal stem cells increased and PDGFR +/Sca-1+ cells decreased. We consider that miRNA146b-5p is effective in the prevention of scar formation by regulating the expression of PDGFR that promotes the proliferation of mesenchymal cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：microRNA bFGF 癒痕抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷における線維芽細胞の過剰な増生は過度の瘢痕を形成し、引きつれや拘縮による機能障害から患者の QOL 低下を招く。その対症療法はあるが、過度な瘢痕形成を抑制するような予防方法は確立されていない。我々は皮膚創傷において basic fibroblast growth factor (bFGF) が治癒過程の後期に線維芽細胞の線維化機能が低下し、瘢痕形成が抑制されることを明らかにした。近年、線維化関連遺伝子の発現を抑制する microRNA(miRNA) の関与が報告されている(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きたが、様々な因子が関与しているため線維化を特異的に制御する miRNA とその標的 mRNA については不明である。

したがって、線維化の抑制に有効な miRNA とその標的 mRNA の関与を実証することは過剰な瘢痕化を標的分子の発現制御から予防する新規治療法の開発に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が従来報告してきた皮膚創傷治癒における bFGF による瘢痕線維化の抑制機構に miRNA とその標的 mRNA の関与を明らかにすることである。

そのため、Sprague Dawley(SD)ラットを用いて皮膚創傷における瘢痕の形成に関与する miRNA とその標的 mRNA を探索する。さらに、瘢痕の形成過程においてどのような細胞の関与を明らかにすることにより bFGF による線維化抑制の機序を標的分子の発現制御から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) bFGF による皮膚創傷の線維化抑制に関連する miRNA とその標的 mRNA の同定

miRNA マイクロアレイによる網羅的解析と標的 mRNA の選定

培養線維芽細胞に bFGF を添加後、48、96 時間目に Aglent Technologies 社の Rat miRNA Microarray にて約 800 個のラット miRNA を網羅的に解析する。コントロールと比較して bFGF 投与後、48、96 時間ともに Normalized Raw が 1.5 倍以上増加した miRNA を線維化抑制に関連する miRNA 選定する (Zhu L, et al. PLoS One. 2015; 16:10)。変化のあった miRNA について TargetScan 解析から miRNA の標的 mRNA を選定する。

miRNA および標的 mRNA の比較検討

選定した miRNA および mRNA について培養線維芽細胞を用いてその発現量を Real-Time PCR にて定量化し検討する。また、培養線維芽細胞に bFGF、miRNA mimic とそのコントロールを添加し、標的 mRNA の発現変化についてウェスタンブロッティングおよび Real-time PCR を行う。

Luciferase reporter assay による標的 mRNA の確認

miRNA の標的が選定した mRNA であることを確認するために、培養皮膚線維芽細胞に Dual-Gio luciferase reporter plasmids を用いて選定した mRNA 配列をトランスフェクションした。トランスフェクション後 10nM miRNA146b-5p を添加し、luciferase reporter assay を行った。

(2) 皮膚創傷における miRNA および mRNA の発現解析

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。

miRNA 産生細胞の同定

皮膚潰瘍肉芽組織において miRNA の発現を in situ hybridization 法で解析する。また、発現細胞の局在性について比較検討を行う。

標的 mRNA 発現細胞の同定

皮膚潰瘍肉芽組織における標的 mRNA の発現について免疫染色による検討を行う。miRNA の発現結果と比較し、miRNA とその標的 mRNA の相互関係から創傷治癒過程における mRNA の発現機序について検討する。

(3) 線維化関連因子の発現解析

miRNA およびその標的 mRNA がどのような線維化関連因子に関連しているか比較検討を行う。培養線維芽細胞に bFGF 刺激後、miRNA mimic とコントロールを添加し、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。

(4) miRNA の骨髄間葉系幹細胞(born marrow derived mesenchymal stem cell)への影響

皮膚潰瘍肉芽組織における miRNA の標的 mRNA のタンパク発現と幹細胞のマーカーを 2 重染色による細胞の同定を行い幹細胞への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 線維化を抑制に関連する miRNA と標的 mRNA の同定

bFGF を添加した培養皮膚線維芽細胞を Rat miRNA Microarray にて網羅的に解析した結果、投与後 48 および 96 時間で Normalized Raw が 1.5 倍以上増加した miRNA は miRNA146b-5p であることが確認できた。増加が確認できた miRNA146b-5p の標的 mRNA について TargetScan 解析を行い、Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)を選定した。選定した PDGFR が miRNA146b-5p により影響を受けるかについて培養皮膚線維芽細胞に miRNA146b-5p

inhibitor および mimic をトランスフェクションし、ウェスタンブロッティングにて検証を行った。その結果、mimic を導入した細胞では PDGFR の発現抑制が確認された (Figure 1)。さらに、miRNA146b-5p の標的 mRNA が PDGFR であることを実証するため、luciferase reporter assay による検証を行った。皮膚創傷部肉芽組織由来の培養線維芽細胞に NA22 target prediction program で選定された PDGFR の下流非翻訳領域 (3' UTR) (Site A: 4822-4846 PDGFR 3' UTR, Site B: 1289-1308 PDGFR 3' UTR) をトランスフェクションし、miRNA146b-5p を添加したところ、PDGFR (WT PDGFR 3' UTR) の活性は抑制された。特にヌクレオチド 4822-4846 (Site A) では luciferase reporter activity の有意な低下が認められた。しかしながら、変異型 (Mut PDGFR 3' UTR) を導入した細胞では活性の低下は認められなかった (Figure 2)。以上から、PDGFR が miRNA146b-5p の標的 mRNA であることが確認された。

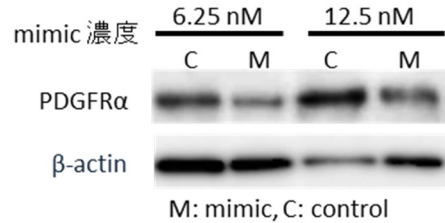


Figure 1. ウェスタンブロッティングによる miRNA146b-5p mimic 導入細胞における PDGFRα の検出

線維芽細胞に bFGF 刺激を行うことによる miRNA146b-5p とその標的 mRNA である PDGFR の変化について real time PCR でその発現について解析を行った。その結果、bFGF 刺激により miRNA146b-5p は増加し、PDGFR は減少していた。このことから bFGF は線維芽細胞に作用して miRNA146b-5p を誘導し、その標的 mRNA である PDGFR の発現を低下させることにより線維化を抑制する可能性が示唆された。

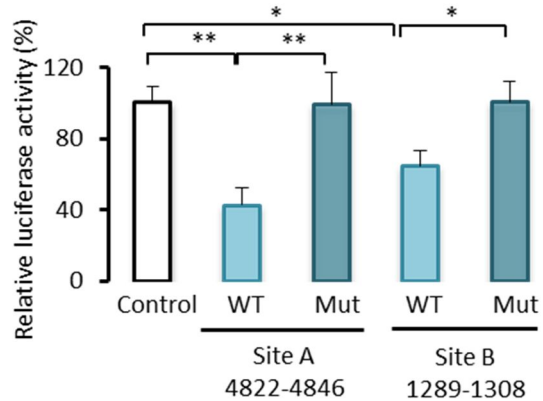


Figure 2. Luciferase reporter assay

(2) miRNA146b-5p による線維化への影響

miRNA146b-5p が線維化の抑制にどのように影響をしているか確認するため、線維化抑制因子について検討を行った。培養線維芽細胞に miRNA 146b-5p mimic をトランスフェクションした後、線維化関連因子 mRNA について real time PCR を用いて定量解析を行った (Figure 3)。miRNA146b-5p mimic をトランスフェクションした線維芽細胞では Collagen type I mRNA の発現低下が認められた。Inhibitor をトランスフェクションした細胞では Collagen type I mRNA の発現増加が認められたことから、miRNA 146b-5p は標的 mRNA である PDGFR の発現を制御することで線維化関連因子の発現を抑制することが示唆された。

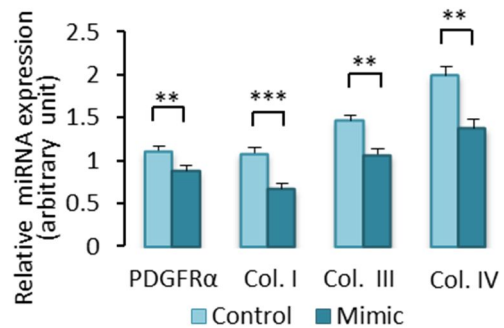


Figure 3. 線維化関連因子の発現量

(3) 皮膚創傷部における bFGF による miRNA146b-5p および PDGFR への影響

皮膚創傷部において mRNA146b-5p と PDGFR が bFGF による影響についてラット背部全層欠損潰瘍部に bFGF を添加後経時的に肉芽組織における mRNA の発現を確認した。その結果、bFGF 添加することにより 3 日目に miRNA146b-5p と PDGFR の発現増加が認められた。しかしながら 7 日目には PDGFR の発現がコントロールに比べ著しく低下した。このことは bFGF により早期に発現が誘導された miRNA146b-5p が PDGFR の発現を抑制したと考えられる。

また、ラット皮膚創傷肉芽組織における miRNA146b-5p の発現について in situ hybridization 法で検討した結果、筋肉周囲を含む間質細胞に発現増加が認められた。しかしながら PDGFR 蛋白との二重染色では両分子の共発現は認められなかった。

(4) 皮膚創傷部における bFGF の Mesenchymal stem cell (MSC) への影響

Mesenchymal stem cells (MSCs) の増殖分化において PDGFR の関与が報告されていることから MSCs を含む PDGFR +/Sca-1+細胞に対する miRNA146b-5p の影響について検討した (Figure 4)。ラット皮膚創傷部へ bFGF を投与後、経時的に肉芽組織の免疫染色を行った。その結果、bFGF 投与後 2, 7, 14 日で miRNA146b-5p+/Sca-1+細胞の増加が認められた。さらに、PDGFR +/Sca-1+細胞では有意な減少が認められた (Figure 4)。次に、bFGF シグナルを抑制する FGFR1siRNA を投与した創部では miRNA146b-5p+/Sca-1+細胞の減少と PDGFR +/Sca-1+細胞

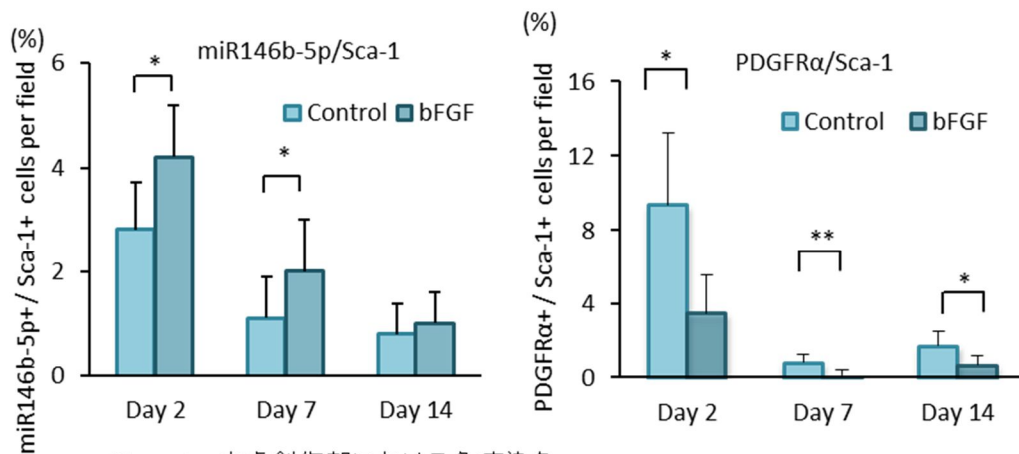


Figure4. 皮膚創傷部における免疫染色

の増加が確認された。これらの結果から、miRNA146b-5pの標的 mRNA は PDGFR であることから PDGFR +/Sca-1+細胞の PDGFR 発現が miRNA146b-5p によって抑制されることが示唆された。

以上の結果から、皮膚創傷の治癒過程において認められる bFGF の線維化抑制作用は bFGF が miRNA146b-5p を誘導することで制御していると考えられる。誘導された miRNA146b-5p は PDGFR mRNA に作用し、PDGFR の発現を低下させる。PDGFR の発現低下により線維化関連因子である collagen の発現が低下することにより線維化を制御すると示唆された。また、miRNA146b-5p が PDGFR +/Sca-1+細胞の PDGFR に作用し、その発現を抑制することが示唆されたことから miRNA146b-5p が PDGFR 陽性 MSCs に作用し、線維芽細胞への分化を制御することで線維化抑制に働いていることが考えられる。

これらの結果は、miRNA146b-5p が慢性創傷などで起こりうる過剰な癒痕形成を抑制し、清浄な治癒へと導く治療法開発に有用であると考えられる。今後は miRNA146b-5p の生体内における作用について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 藤澤 千恵、青木 茂久、岡根谷 哲哉、中道 美保、深澤 由里、本間 尚子、大西 清、三上 哲夫、赤坂 喜清
2. 発表標題 コラーゲンゲル三次元培養による骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の誘導 と管腔様構造の形成
3. 学会等名 第 107 回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉、中道美保、藤澤千恵、青木茂久、三上哲夫、大西清、赤坂喜清
2. 発表標題 組織修復における骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)による血管新生メカニズム
3. 学会等名 第37回分子病理学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉†、中道美保†、藤澤千恵†、青木茂久、荻野晶弘、岡田恵美、三上哲夫、大西 清、赤坂喜清
2. 発表標題 コラーゲンゲル3次元培養による肉芽組織からの骨髄間葉系前駆細胞 (Fibrocyte)の誘導
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Chie Fujisawa, Tetsuya Okaneya, Miho Nakamichi, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Sachie Kanada, Tetsuo Mikami
2. 発表標題 Possible role of bFGF-induced miR146b-5p expression in wounds for tissue repair.
3. 学会等名 The 107th Annual Meeting of The Japanese Society of Pathology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Tetsuya Okaneya, Chie Fujisawa, Miho Nakamichi, Kiyoshi Onishi, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Tetuo Mikami
2. 発表標題 Phenotypic Change In Angiogenic Fibrocytes In Planter Decubitus Ulcers In Rats.
3. 学会等名 2018 WHS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤坂喜清、藤澤千恵
2. 発表標題 慢性炎症の癍痕線維化を制御するmicroRNA探索と機能解析
3. 学会等名 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「自己免疫疾患の制御をめざす研究拠点形成」平成29年度事業報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡根谷哲哉 中道美保 藤澤千恵 木村裕美 青木茂久 武田慶 荻野晶弘 岡田恵美 三上哲夫 大西清 赤坂喜清
2. 発表標題 創傷治癒における肉芽組織細胞による管腔様構造の形成とbFGFの関与
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤坂喜清 藤澤千恵 中道美保 岡根谷哲哉 深澤由里 大西清 三上哲夫
2. 発表標題 創傷治癒の癍痕線維化を制御するmicroRNAの探索 と機能解析
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中道美保 岡根谷哲哉 藤澤千恵 深澤由里 三上哲夫 河越尚幸 今井常彦 瓜田純久 大西清 赤坂喜清
2. 発表標題 ラット隆起性皮膚病変 における骨髄間葉系前駆細胞(Fibrocyte)の発現変化と血管新生
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡根谷哲哉、中道美保、藤澤千恵、青木茂久、武田 慶、荻野晶弘、岡田恵美、三上哲夫、大西 清、赤坂喜清
2. 発表標題 創傷治癒における修復細胞による血管新生とbFGFの関与
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Miho Nakamichi, Chie Fujisawa, Yuri Fukasawa, Naoko Honma, Kiyoshi Onishi, Tetuo Mikami
2. 発表標題 bFGF Enhances Vascular Formation through Induction of Angiogenic Properties of Fibrocytes
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chie Fujisawa, Hiroko Kodama, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Tetuo Mikami, Yoshikiyo Akasaka
2. 発表標題 Novel genetic mutations in Menkes disease associated with clinical course in Japan
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshikiyo Akasaka, Miho Nakamichi, Chie Fujisawa, Kiyoshi Onishi, Tetsuya Okaneya, Yuri Akishima-Fukasawa, Naoko Honma, Tetsuo Mikami
2. 発表標題 Induction of angiogenic properties of brocytes by bFGF leading to vascular formation during wound healing
3. 学会等名 Wound Healing Society 29th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017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	大西 清 (Oonishi Kiyoshi) (30194228)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	
研究分担者	深澤 由里 (Fukasawa Yuri) (90392331)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	