

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17021

研究課題名(和文) 糖尿病性創傷炎症制御miR-129ファミリーによる新規分子標的治療薬開発への展開

研究課題名(英文) Development of a novel molecular targeted drug for diabetic wound using the inflammatory-related miR-129 family

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病(DM)性皮膚創傷治癒は遅延し、難治性皮膚潰瘍になることが知られている。治癒遅延の要因として炎症が長期化すること、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た。そこで、DM由来好中球におけるmicroRNA(miRNA)を中心とした遺伝子発現制御機構の解明によるDM性創傷治癒促進を目的として、DM由来好中球特異的に発現するmiRNA(miR-129ファミリーなど)及びそれらが発現制御する標的遺伝子を同定し、機能解析を行った。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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性創傷の発症は糖尿病(DM)患者の15%に起こり、症例の80%以上で下肢の切断などQOLの低下をもたらす。従って、DM性創傷に対する治療法開発の要求度は社会的に高まっており、新規治療法の開発は急務であると考えられる。本研究は、新規治療薬開発への有用性が非常に高いmicroRNA(miRNA)に着目し、DM性創傷治癒過程におけるDM由来好中球の遺伝子発現制御機構の一端を解明した。これにより治癒促進効果のある新規分子標的治療薬開発へ展開するための基礎医学研究から臨床医学への還元が期待される。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is known to delay wound healing and cause complications such as foot ulcers. We have previously shown that neutrophil retention in diabetic cutaneous wounds is aberrant in mice and inflammation is prolonged, and that this pathogenesis may result from dysfunction of diabetes-derived neutrophils. To clarify the molecular mechanism that regulates inflammation in diabetes-derived neutrophils, we identified specific miRNAs (e.g. the miR-129 family) and their targeted mRNAs, and we analyzed the miRNA function. In this study, we clarified some functions of inflammation-related miRNAs and their target mRNAs using cellular and molecular biology.

研究分野：形成外科学

キーワード：創傷治癒 好中球 糖尿病 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。創傷治癒過程は、炎症期・増殖期・成熟期で構成されている。先行研究において我々は、創傷治癒遅延の要因として炎症が長期化すること、またその本態としての DM 由来好中球が、炎症制御に關与する機能異常を生じた可能性を示唆した。

microRNA (miRNA) は、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おり、標的 mRNA に結合することでその発現を制御し、蛋白質合成を阻害する。近年、生体内の炎症過程における miRNA 機能の重要性が明らかとなっている。従って、糖尿病性皮膚創傷の治癒過程における炎症制御への miRNA の關与が推察される。そこで我々は、miRNA を中心とした遺伝子発現制御機構の解明による糖尿病性創傷治癒促進を目的として、独自に抗 Argonaute2 (Ago2) 抗体を用いた免疫沈降法による成熟 miRNA を精製した。次に Microarray 法を用いて、DM 由来好中球特異的に発現する miRNA (miR-129 ファミリーなど) を同定した。miR-129 ファミリーは、癌疾患における細胞輸送や増殖、アポトーシスへの關与が報告されている。我々は miR-129 ファミリーに着目し、miR-129 ファミリーと炎症関連遺伝子群の分子相関性を明らかにするべく、解析ソフト GeneSpring により標的 mRNA を予測、それらに対し Gene Ontology (GO) 解析・Pathway 解析を行った。その結果、標的 mRNA 群が炎症反応や遊走、アポトーシスに關与し、DM 由来好中球で有意な発現変動を示したことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究成果をもとに、DM マウスの好中球機能制御に關与する炎症関連 miR-129 ファミリーを中心とした発現制御による創傷治癒促進効果を検討し、臨床応用に展開するための基礎研究を行う。

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、雌雄ともに繁殖能力を保持していないため、系統維持については db/+m マウス (ヘテロマウス) の交配により行った。

(2) 好中球、マクロファージ、B 細胞、T 細胞の分離

DM マウスの下肢骨より 27 ゲージ針を用いて、骨髓を PBS で洗い出し、19 ゲージ針を用いて懸濁した。その後、Neutrophil isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて骨髓より好中球を分離した。マクロファージ、T 細胞、B 細胞も同様に MicroBead kit を用いて、それぞれ anti-CD11b antibody (Ab)、anti-CD5 Ab、anti-CD19 Ab により分離した。

(3) 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。

(4) 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、mimic は GeneDesign 社にて作製した。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。

(5) In situ hybridization

In situ hybridization (ISH) は、miR ISH buffer set と miRCURY LNA Detection 3' and 5' DIC-labeled probes (QIAGEN) を用いて行った。観察は、Aperio AT Turbo と共焦点顕微鏡を用い、データ解析には NIS-Elements C software v4.13 を用いた。

4. 研究成果

(1) DM 由来好中球及び DM マウス創傷部における miR-129-2-3p 発現解析

qRT-PCR により、DM マウス (図中の表記: Db) の好中球において、miR-129-2-3p 発現が、非 DM マウス (図中の表記: Non-db) と比較し有意に減少したことを認めた (図 1)。また miR-129-2-3p の発現細胞を同定するために、好中球、マクロファージ、B 細胞、T 細胞における発現を検

討したところ、主に好中球に発現していることが示唆された（図2）。

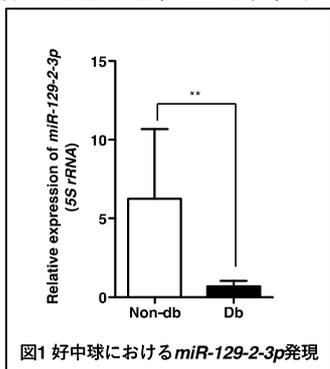


図1 好中球におけるmiR-129-2-3p発現

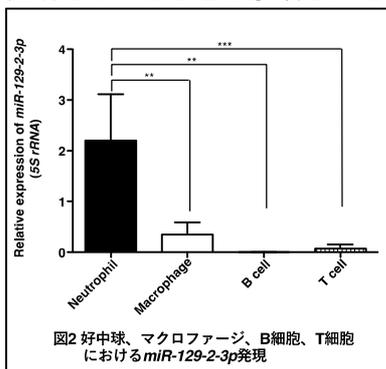


図2 好中球、マクロファージ、B細胞、T細胞におけるmiR-129-2-3p発現

DM マウス創傷部における *miR-129-2-3p* 発現を検討するために、DM マウス背部に創傷を作製し、創傷 2 日（図中の表記：D2W）における創傷部より好中球を分離、qRT-PCR を行った。創傷 2 日の創傷部における好中球は非 DM マウスと比較し、DM マウスで有意に増加していたにもかかわらず（図3）、*miR-129-2-3p* 発現は有意な減少を示した（図4）。これらの結果は、DM 由来好中球では *miR-129-2-3p* が十分に活性化されていないことを示唆する。

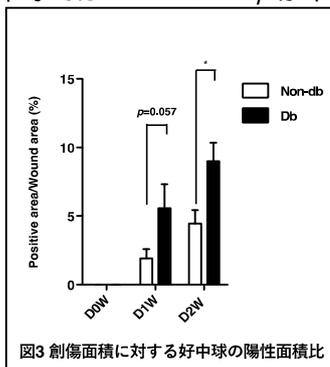


図3 創傷面積に対する好中球の陽性面積比

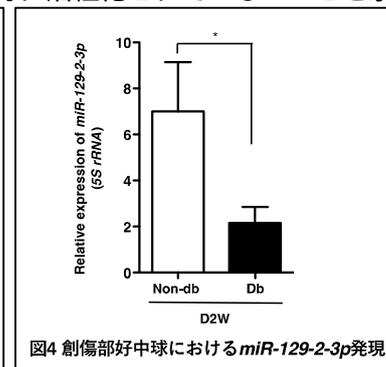


図4 創傷部好中球におけるmiR-129-2-3p発現

(2) *miR-129-2-3p* の標的遺伝子発現解析

GeneSpring により *miR-129-2-3p* の標的遺伝子を予測し、Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、炎症反応に関与する *Casp6* や *Ccr2* などが同定された。DM 由来好中球におけるこれらの遺伝子発現を検討したところ、非 DM マウスと比較し DM マウスで有意な発現増加を示した。創傷 2 日の創傷部においても同様の結果が得られた（図5）。

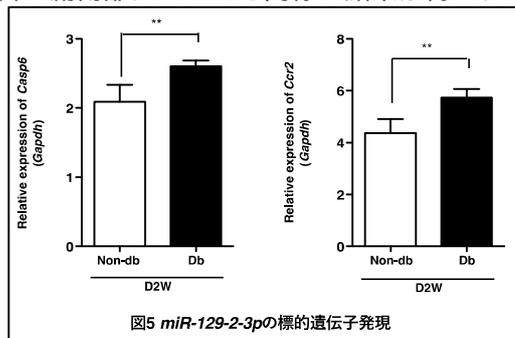


図5 *miR-129-2-3p* の標的遺伝子発現

(3) *miR-129-2-3p* による標的遺伝子発現制御

miR-129-2-3p の標的遺伝子と予測された *Casp6*、*Ccr2* において、制御関係を検討するために、3T3 細胞に *miR-129-2-3p* 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-129-2-3p* 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6）。

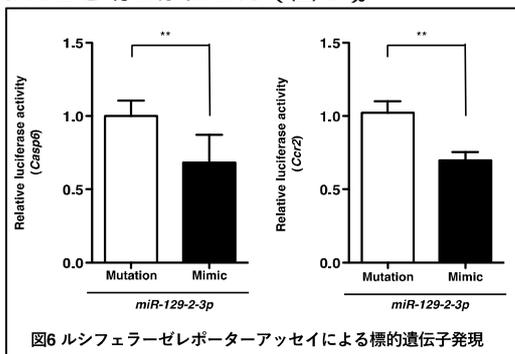
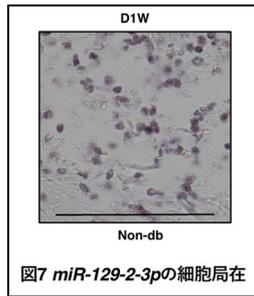


図6 ルシフェラーゼレポーターアッセイによる標的遺伝子発現

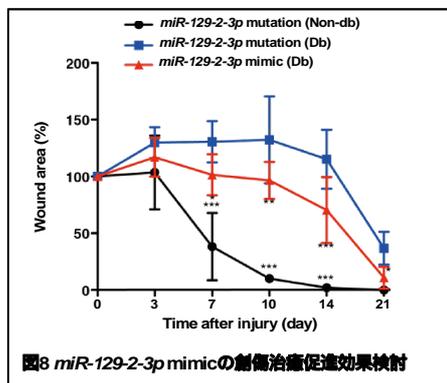
(4) *miR-129-2-3p* の細胞局在

急性炎症において、*miR-129-2-3p* がどの細胞に発現しているかを検討するために、創傷 1 日 (図中の表記 : D1W) の創傷部における ISH を行ったところ、主に創傷部に浸潤している好中球に発現していることが示唆された (図 7) 。



(5) 創傷治癒促進効果の検討

創傷治癒過程における *miR-129-2-3p* の病態生理学的役割を検証するために、DM マウス背部に創傷を作製し、*miR-129-2-3p* mimic とコントロールとしての mutant をそれぞれ pluronic F-27 gel と混合し、創傷部に塗布、創傷閉鎖率を計測した。その結果、創傷閉鎖は、創傷 7 日-21 日で有意に促進した (図 8) 。



従って、DM 由来好中球における *miR-129-2-3p* の活性化が、炎症に關与する遺伝子発現を効果的に制御することで、障害を受けたバイオリジカルプロセスが改善され、創傷治癒を促進した可能性が示唆された。

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 Umehara T, Mori R, Mace KA, Murase T, Abe Y, Yamamoto T, Ikematsu K	4. 巻 68
2. 論文標題 Identification of Specific miRNAs in Neutrophils of Type 2 Diabetic Mice: Overexpression of miRNA-129-2-3p Accelerates Diabetic Wound Healing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 617-630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db18-0313	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takahiro Umehara
2. 発表標題 Identification of specific microRNA in diabetic-derived neutrophils: functional analysis of miR-129-2-3p in inflammation-related genes
3. 学会等名 EMBL Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Umehara
2. 発表標題 Identification of specific microRNA in diabetic-derived neutrophils: overexpression of miR-129-2-3p accelerates diabetic wound healing.
3. 学会等名 EMBO conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 2型糖尿病由来好中球特異的なmicroRNAの同定及び機能解
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Umebara
2. 発表標題 Identification of specific microRNAs in neutrophils of type 2 diabetic mice: functional analysis of miR-129-2-3p and inflammation-related genes
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Umebara
2. 発表標題 Identification of specific microRNAs in diabetic-derived neutrophils: functional analysis of miR-129-2-3p and inflammation-related genes
3. 学会等名 33rd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 Identification of specific microRNAs in diabetic-derived neutrophils: functional analysis of miR-129-2-3p and inflammation-related genes
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Umebara
2. 発表標題 Identification of specific circular RNAs in diabetic-derived neutrophils
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅原敬弘
2. 発表標題 糖尿病由来好中球の炎症制御に関するcircular RNAの同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	森 亮一 (MORI Ryoichi)		
研究協力者	メイス キンバリー (MACE Kimberly)		