

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592716

研究課題名(和文) MiR-21とTGFβ シグナル経路の相互作用：難治性創傷における重要性

研究課題名(英文) Interaction between miR-21 and TGFβ: Role in chronic non-healing wounds

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病性創傷におけるmiR-21とTGFβの相互作用を明らかにし、糖尿病性創傷治癒に対しmiR-21の役割を評価することにした。マウス繊維芽細胞を用いた実験により、高糖条件下でのmiR-21の発現を調べたところ、TGFβ1によるmiR-21の発現増加が見られた。TGFβ1によるmiR-21の発現増加にはNFκB転写制御因子活性を介した反応性酸素生成物(ROS)活性化が必要であることを明らかにした。miR-21が創傷部位への細胞遊走に必要であるが、糖尿病性マウスから得られた線維芽細胞では発現低下されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to investigate the interaction between TGFβ1 and microRNA miR-21 in diabetic wounds, and to evaluate the role of miR-21 in diabetic wound healing. Employing mouse skin fibroblast cells, we found that TGFβ1 enhances miR-21 expression in hyperglycemic conditions. TGFβ1 effect on miR-21 was dependent on NFκB induced ROS generation. MiR-21 was found to promote cell migration towards wound area. Analysis of diabetic fibroblast cells revealed that miR-21 was downregulated in these cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：創傷治癒 MicroRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性創傷の重要な原因の一つとして、創傷治癒機転の異常が挙げられる。遷延性炎症期が続き、正常の治癒機転が働かず難治性にな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関与していると報告されている。TGF 1は、創傷部位へ遊走した線維芽細胞に作用し、コラーゲン合成、沈着を促進し、新しいECMの構築に欠かせない制御因子である。TGF 1とその受容体は急性創傷において高発現されるけれども、糖尿病性創傷を含む難治性創傷において発現がかなり減少している。

(2) 最近、低分子 RNA である microRNA (miRNA) が様々な疾患に関与することが次々と明らかになってきた。miRNA は 18 - 25 塩基からなる低分子 RNA であり、標的 mRNA の機能を抑制することで、多くの生命現象を制御している。miRNA の制御異常は、さまざまな疾病の病態生理的機序に関係していると知られている。糖尿病性創傷を含む創傷治癒機転の異常にどのように関与しているかは不明であるが、血管新生、細胞遊走、細胞増殖を調節する miRNA はいくつか識別されており、miRNA は創傷治癒においても機能的な役割を持つことが考えられる。最近、我々は糖尿病性創傷における miR-21 調節が正常とは異なり、創傷治癒期に著しい発現低下が認められることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 幾つかの疾患の病態生理において miR-21 と TGF 1 の間の相互作用が報告されている。TGF 1 は肺線維芽細胞で miR-21 発現を増強し、さらに miR-21 が TGF 1 によって誘発される筋線維芽細胞分化を調節し、肺線維症を促進する TGF シグナル経路を増強したことが報告されている。しかし、糖尿病性創傷を含む難治性創傷における miR-21 と TGF 1 間の相互作用と創傷治癒機転の異常との関連は未知である。

(2) 最近、我々は糖尿病性創傷における miR-21 調節が解除されていることを識別した。病態生理学的に miR-21 と TGF ファミリーとの機能的相互作用が確立されている。TGF は創傷治癒について重要な役割を果たし、糖尿病性創傷において発現が負に制御されている。

(3) 本研究は、糖尿病性創傷において miR-21 と TGF ファミリーの相互作用を明らかにし、糖尿病性創傷治癒に対し miR-21 の潜在的役割を評価する。

3. 研究の方法

(1) miRNA 遺伝子発現が糖尿病性マウスと正常マウスによって異なるため、糖尿病性マウスおよび正常マウスから得られた細胞を採取し検討する必要がある。フローサイトメトリーを用いて、正常マウス (CD マウス) および糖尿病マウス (KKAY : 非肥満性 ; hypoinsulinemic) の皮膚から線維芽細胞を flow cytometry 法により分離する。分離した細胞を用いて、in vitro (生体外系) 実験を行う。Realtime PCR 法により miR-21 発現を比較する。更に、miR-21 前駆物質あるいはアンタゴニストを使用し miR-21 発現を過剰およびノックダウンした細胞を作る。miR-21 発現を過剰およびノックダウンした細胞を使用し scratch assay を用いて細胞遊走への miR-21 の影響を検討する。

(2) miR-21 発現への TGF 1 の効果: TGF 1 の過剰発現およびノックダウン細胞における miR-21 の発現量を調べることにより、TGF 1 が miR-21 発現に与える影響を知る。ゲノムから転写された miRNA 前駆体 (primary miRNA ; Pri-miRNA) は dicer と drosha という RNA 分解酵素により段階的にプロセッシングを受けて precursor miRNA (pre-miRNA) と成熟 miRNA (mature miRNA) となる。それぞれ特異的なプローブを用いた Realtime PCR 法および CHIP 法によりどちらの段階で miR-21 遺伝子が TGF 1 による発現誘導を受けていることが明らかにする。更に、TGF 1 が SMAD 蛋白質等を介して標的遺伝子を制御する可能性があるため、SMAD 蛋白質の役割を RNA-免疫沈澱法により検定する。

(3) miR-21 遺伝子のプロモーター領域には転写制御因子である AP-1, PU.1, C/EBP, SP-1, NF-1, SRF, p53, NFkB などの結合部位がある。miR-21 プロモーター中にあるどちらの転写御製因子が TGF 1 による活性化されるかは EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) により明らかにする。EMSA 方法ではそれぞれ転写御製因子のオリゴを用いて細胞核内の活動を調べる。このことでどちらの転写御製因子を介して TGF 1 による miR-21 発現制御を受けていることが明らかになる。

4. 研究成果

(1) マウス線維芽細胞を用いての実験により、高糖条件での miR-21 の発現を調べたところ、TGF 1 による miR-21(primary,

precursor, mature 段階での) 発現増加が見られた。TGF 1 による miR-21 発現増加が NFkB の抑制物質又は抗酸化剤により抑制された。細胞内へ NFkB 遺伝子導入して見たところ NFkB 実態 miR-21 の発現を誘導することが確認された。更に、細胞内 ROS 活性化が必要であることが分かった。NFkB が TGF 1 による活性化され、細胞内 ROS 活性を起し miR-21 の発現を誘導することが明らかになった。

(2) 通常の場合 NFkB 蛋白質複合体の p65 サブユニットは抑制蛋白質である Ikbα と結合して不活性状態までである。TGF 1 刺激により Ikbα が分解され p65 サブユニットが細胞質から核へ移動される。核内で NFkB が標的遺伝子のプロモーター領域に存在する結合配列と結合して標的遺伝子の転写を引き起こす。MiR-21 遺伝子にも NFkB の結合配列が存在しており、NFkB による遺伝子転写は可能である。TGF 1 刺激により NFkBp65 が miR-21 遺伝子に結合することが CHIP 法により確認された。

(3) TGF 1 が SMAD 蛋白質等 (SMAD2, 3, 4) を介して標的遺伝子の発現を制御する。SMAD 蛋白質 2, 3, 4 が細胞質から核内へ移動される。Primary miR-21 mRNA トランスクリプトに SMAD 蛋白質の結合配列が存在している。TGF 1 刺激により NFkB 活性化を介して SMAD2, 3, 4 が Pri-miR-21 と結合されることが RNA-IP (RNA-免疫沈澱) 法により検討された。

(4) 正常マウスおよび糖尿病性マウスの皮膚から線維芽細胞を flowcytometry 法により分解した。RealTime PCR 法で遺伝子発現パターンを調べたところ糖尿病性マウスから得られた線維芽細胞においての miR-21 遺伝子が下方制御されていることが確認された。MiR-21 前駆物質あるいはアンタゴニストを使用し miR-21 発現を過剰およびノックダウンした細胞を作った。Scratch assay 法により細胞層に傷付け創傷部位への細胞遊走を検討した。MiR-21 が細胞遊走に重要であることが確認された。

(5) まとめに、NFkB 介しての TGF シグナル経路が miR-21 発現におよぼす影響を知ることができた。創傷部位への細胞遊走に miR-21 が必要であることを知ることができた。

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)

- (1) Radha Madhyastha, Harishkumar Madhyastha, Yutthana Pengjam, Yuichi Nakajima, Sayuri Omura, Masugi Maruyama. NFκB activation is

essential for miR-21 induction by TGFβ1 in high glucose conditions. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 451, 2014, 615-621

〔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, 中島融一, 大村さゆり, 丸山真杉, Expression pattern of microRNAs related to cell development and differentiation during healing of diabetic wounds. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, September 2-6, 2012, Yokohama, Japan
- (2) マドゥエスタ ラダ, マドゥエスタハリシャクマール, ペンジャムユッタナ, 中島融一, 丸山真杉, NFκB dependent induction of miR-21 by TGFβ1 in high glucose conditions. 24th annual meeting of the European Tissue Repair Society, September 10-12, 2014, Edinburgh, UK

〔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:
出願年月日:
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：