

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689069

研究課題名(和文)炎症性低分子RNAが司る組織修復制御機構の解明と分子標的核酸医薬の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanism of inflammation-related miRNA in tissue repair and antisense oligodeoxynucleotide development

研究代表者

森 亮一(MORI, Ryoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：30509310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚創傷治癒過程における miR-223 および Foxo1 機能解析を行った。miR-223 KO マウスは、過剰な好中球活性化による治癒遅延が認められた。興味深いことに、黄色ブドウ球菌感染 miR-223 KO マウスは、コントロールと比較して、創傷治癒が促進した。したがって miR-223 欠損好中球は、黄色ブドウ球菌感染創において有益であると示唆された。

Foxo1ヘテロ欠損マウスは、ケラチノサイトの活性化、瘢痕形成および炎症反応減弱と相まって、創傷治癒が促進した。Foxo1 アンチセンスオリゴは、創傷治癒促進効果を有することが示された。Foxo1 は分子標的になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated function of miR-223 and Foxo1 in skin wound healing. Skin wound healing in miR-223 KO mice was delayed concomitant with altered neutrophil activation. I showed that miR-223 KO mice undergo prolonged acute inflammatory responses at wound sites due to miR-223 KO-derived neutrophils exhibiting increased hyperoxidative bursts. Intriguingly, *S. aureus*-infected miR-223 KO mice showed markedly faster skin wound healing than *S. aureus*-infected wild-type mice. Our data indicate that the molecular targeting of miR-223 may regulate the healing of bacterium-infected chronic skin wounds. Foxo1 heterozygous mice led to accelerated skin wound healing with enhanced keratinocyte migration and reduced scarring accompanied by an attenuated inflammatory response. Transient knockdown of Foxo1 at the wound site by local delivery of antisense oligo enhanced skin wound healing. Overall, molecular targeting of FOXO1 may improve the quality of healing and reduce pathological scarring.

研究分野：創傷治癒

キーワード：皮膚創傷治癒 miRNA Foxo 炎症

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷治癒過程は、炎症細胞の浸潤が顕著に認められる炎症期、再上皮化や肉芽形成が活発に行われる増殖期、最後に過剰に生産された細胞外基質が分解される成熟期から構成される生体防御反応である。この一連の過程は細胞表面やサイトカインを介した細胞間相互作用で制御されている。通常、創傷治癒後に瘢痕(傷跡)が残る。しかし、胎生期における皮膚修復部位には瘢痕が認められず、皮膚組織が完全に再生することが知られている。組織学的な精査によって、創傷部位に炎症細胞の観察されないことから、炎症細胞が瘢痕形成に関与していると考えられているが、その分子メカニズムは未だ明らかではない。

microRNA (miRNA) は、標的 mRNA に作用して蛋白質翻訳抑制に関与する非コード RNA である。私達は、皮膚創傷における炎症反応関連 miRNA の同定に成功した。これら miRNA は、炎症や瘢痕形成に関与していると考えられるが、未だ機能は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症関連 miRNA として同定した miR-223 および Foxo ファミリー (miR-223 標的 mRNA) の機能解明および核酸医薬の開発である。

3. 研究の方法

(1) 皮膚創傷治癒モデルマウス

マウス背部を剃毛し、直径 4 mm の皮膚打ち抜き損傷を施し作製した。その後、経時的に創傷部位を摘出し(直径 6 mm)、病理学的検査や分子細胞生物学的解析などを行った。

(2) 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 感染モデルマウス

(独) 製品評価技術基盤機構より *S. aureus* 基準株を入手した。創傷を作製したのち、*S. aureus* (1×10^8 CFU/10 μ L) を速やかに滴下し、モデル動物を作製した。

(3) 糖尿病モデルマウス

1 型糖尿病モデルマウスは、ストレプトゾトシン (STZ) を投与し作製した。2 型糖尿病モデルマウスは、糖尿病自然発症 *db/db* マウスを用いた。

(4) 生体 MPO 活性化イメージング解析

XenoLight Redirect Inflammation Probe (PerkinElmer) を腹腔内へ投与し、IVIS Lumina II System (PerkinElmer) を用いて解析を行った。

(5) 好中球活性化イメージング解析

2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (APF) (五稜化学) を用いて好中球由来の次亜塩素酸を測定した。

4. 研究成果

(1) miR-223 KO マウスを用いた機能解析
miR-223 KO マウスを用いて無菌性皮膚創傷治癒解析を行った。その結果、miR-223 KO マウスは、創部における好中球活性化制御の破綻による、治癒遅延が認められた(図 1)。



図 1 MPO 活性を指標として *in vivo* live imaging を行った。miR-223 KO マウスは、持続的な好中球活性化が認められた。

さらに、*in vitro* においても持続的な好中球活性化が認められた(図 2)。従って miR-223 は、創部における急性炎症の惹起および収束に必須であると考えられる。

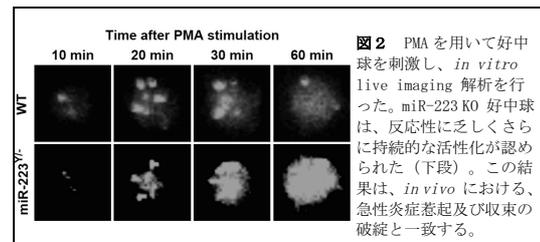


図 2 PMA を用いて好中球を刺激し、*in vitro* live imaging 解析を行った。miR-223 KO 好中球は、反応性に乏しくさらに持続的な活性化が認められた(下段)。この結果は、*in vivo* における、急性炎症惹起及び収束の破綻と一致する。

上記解析結果より、創部 miR-223 KO 好中球は、過剰な活性化が認められた。*In vitro* であるが、miR-223 KO 好中球は、カンジダに対する殺菌力上昇が認められている。従って miR-223 KO 好中球は、殺菌力が要求される感染創においては有利に機能すると仮定した。そこで、*S. aureus* 感染皮膚創傷モデルを用いて、肉眼的観察を行った。その結果、miR-223 KO マウスは、明らかな治癒の改善が認められた(図 3)。

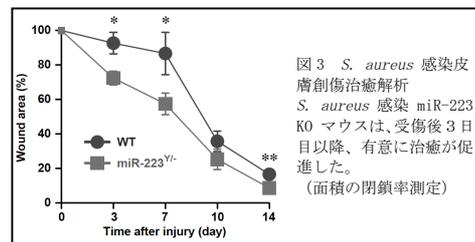


図 3 *S. aureus* 感染皮膚創傷治癒解析
S. aureus 感染 miR-223 KO マウスは、受傷後 3 日目に降、有意に治癒が促進した。(面積の閉鎖率測定)

(2) 糖尿病 miR-223 KO マウスを用いた機能解析

従来、糖尿病性潰瘍における好中球機能は、予後決定因子として重要視されている。一方、瘢痕と好中球活性化機能の関連性も明らかでは無い。そこで STZ 誘導 1 型糖尿病 miR-223 KO マウスおよび 2 型糖尿病 miR-223 KO (miR-223 KO: *db/db*) マウスを用いて機能解析を行った。その結果、上記

モデルマウスは、治癒遅延のみならず瘢痕化が増悪することが明らかとなった(図4)。



図4 miR-223 は糖尿病性皮膚創傷治癒に必須である。1型糖尿病発症 miR-223 KO マウスは、皮膚創傷治癒が遅延した。

本研究により、炎症性 miR-223 の機能が新たに解明された。特に、*S. aureus* 感染 miR-223 KO マウスは、有意な治癒改善が認められたことは、細胞移植治療を考慮する上で興味深い(図3)。今後は、細胞移植治療の可能性の検証または miR-223 AS ODN 投与による解析を行い、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) などの薬剤耐性菌出現による新規対処療法の確立をめざしたい。

(3) Foxo ファミリーの機能解析

Foxo ファミリーは寿命や代謝に関連する転写因子である。炎症や組織修復において役割を担っていると考えられるが、未だ詳細な機能は明らかではない。さらに Foxo1 は、miR-223 の標的分子と推測されている。

皮膚創傷治癒過程において Foxo ファミリーの発現動態を調べた結果、Foxo1 および Foxo3a は、Foxo4 および Foxo6 と比較して、有意に発現が上昇していることが明らかとなった。

(4) Foxo1 HT および Foxo3a KO マウスを用いた機能解析

Foxo1 の発現が有意に減弱している Foxo1 ヘテロ (HT) マウス (Foxo1 KO マウスは胎生致死である) および Foxo3a KO マウスを用いて機能解析を行った。その結果、Foxo1 HT マウスは、顕著に皮膚創傷治癒が促進した。一方、Foxo3a KO マウスは、変化が認められなかった。そこで本研究では、Foxo1 の機能解析を中心に行うことにした。

次に、炎症様態を解析した。その結果、Foxo1 HT マウスは、有意に創部における炎症反応が減弱していた(図5)。

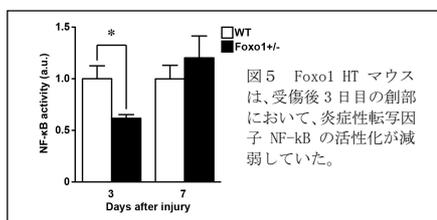


図5 Foxo1 HT マウスは、受傷後3日目の創部において、炎症性転写因子 NF-κB の活性化が減弱していた。

(5) Foxo1 制御遺伝子の包括的同定

受傷後3日目の創部を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、Foxo1 HT マウスでは、創傷治癒促進分子である線維芽細胞増殖因子2 (FGF2)、アディポネクチン、Notch1 およびミオシンなどの発現上昇が認められた。したがって Foxo1 HT マウ

スにおける治癒促進効果の原因は、上記遺伝子群の発現上昇の関与と推察された。

FGF2 は創傷治癒において重要分子の一つである。そこで、Foxo1 および FGF2 の関連性を調べるため、マウス初代培養ケラチノサイト (KC) を用いて解析を行った。その結果、マウス組換え FGF2 蛋白質 (mFGF2) を投与した Foxo1 発現抑制 KC は、コントロールと比較して、有意に細胞増殖および細胞遊走が促進していた。その理由は、ERK1/2 活性化亢進に伴うものと判断された。

(6) 瘢痕化の機能解析

ピクロシリウス染色および電子顕微鏡を用いて瘢痕化の機能解析を行った。その結果、Foxo1 HT マウスでは、1型コラーゲンの発現減少に伴う、瘢痕化の減弱が認められた(図6)。

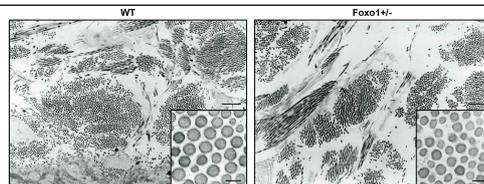


図6 Foxo1 HT マウスの創部におけるコラーゲン密度および直径は、コントロールと比較して、有意に減少していた。

(7) Foxo1 アンチセンスオリゴ (AS ODN) の開発

Foxo1 HT マウスを用いた解析により、Foxo1 発現抑制は、皮膚創傷治癒改善が期待できる。そこで、Foxo1 AS ODN を作製し、治療への応用を検討した。その結果、Foxo1 AS ODN が滴下された皮膚創部は、コントロールと比較して、明らかな創傷治癒促進効果を認めた。

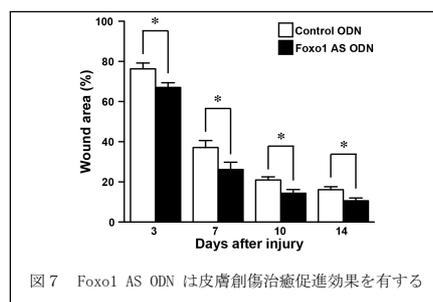


図7 Foxo1 AS ODN は皮膚創傷治癒促進効果を有する

(8) ヒトケロイドにおける FOXO1 発現解析

ヒトケロイドサンプルを用いて、FOXO1 発現を解析した。その結果、ヒトケロイド部位近傍の正常皮膚において、FOXO1 高発現細胞が多数認められた。ケロイド周辺の正常皮膚は、ケロイドへ進展する可能性が高い。ケロイド増悪に FOXO1 が関与していることが示唆された。

本研究により、皮膚創傷治癒過程における Foxo1 の機能が解明された。そして Foxo1 を標的とした分子標的薬剤を用いた治療法の有効性が示された。今後は Foxo1 AS ODN の化学的構造修飾をおこない、Foxo1 AS ODN の持続性・特異性の向上をめざす。また、人為的 Foxo1 活性化制御に資する低分子化合物などの同定に取り組みたいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Doi H, Kitajima Y, Luo L, Yan C, Tateishi S, Ono Y, Urata Y, Goto S, Mori R, Masuzaki H, Shimokawa I, Hirano A, Li TS. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Scientific Reports*, 査読有, 6, 18844, 2016.
DOI:10.1038/srep18844
- ② Nunan R, Campbell J, Mori R, Pitulescu ME, Jiang WG, Harding KG, Adams HG, Nobes CD Martin P. Ephrin-Bs drive junctional downregulation and actin stress fiber disassembly to enable wound re-epithelialisation. *Cell Reports*, 査読有, 13, 1380-1395, 2015.
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.085
- ③ Kim SE, Mori R, Komatsu T, Chiba T, Hayashi H, Park S, Sugawa MD, Dencher NA, Shimokawa I. Upregulation of cytochrome c oxidase subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction. *Age (Dordr)*, 査読有, 37, 9787, 2015.
DOI: 10.1007/s11357-015-9787-8
- ④ Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, Kim SE, Kawata T, Park S, Hayashi H, Yamaza H, Chiba T, Mori R. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*, 査読有, 14, 707-709, 2015.
DOI: 10.1111/acel.12340
- ⑤ Kamohara R, Yamaza H, Tsuchiya T, Komatsu T, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Otabe S, Yamada K, Nagayasu T, Shimokawa I. Overexpression of the adiponectin gene mimics the metabolic and stress resistance effects of calorie restriction, but not the anti-tumor effect,

Experimental Gerontology, 査読有, 64, 46-54, 2015.

DOI: 10.1016/j.exger.2015.02.011

- ⑥ Park S, Fujishita C, Komatsu T, Kim SE, Chiba T, Mori R, Shimokawa I, NPY antagonism reduces adiposity and attenuates age-related imbalance of adipose tissue metabolism. *FASEB Journal*, 査読有, 28, 5337-5348, 2014.
DOI: 10.1096/fj.14-258384
- ⑦ Mori R, Tanaka K, de Kerckhove M, Okamoto M, Kashiya K, Tanaka K, Kim SE, Kawata T, Komatsu T, Park S, Ikematsu K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I. Reduced FOXO1 accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *American Journal of Pathology*, 査読有, 184, 2465-2479, 2014.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.012
- ⑧ Chiba T, Tamashiro Y, Park D, Kusudo T, Fujie R, Komatsu T, Kim SE, Park S, Hayashi H, Mori R, Yamashita H, Chung HY, Shimokawa I. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Scientific Reports*, 査読有, 4, 4517, 2014.
DOI: 10.1038/srep04517
- ⑨ Park S, Mori R, Shimokawa I. Do sirtuins promote mammalian longevity?: A Critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Molecules and Cells*, 査読有, 35, 474-480, 2013.
DOI: 10.1007/s10059-013-0130-x

[学会発表] (計 2 2 件)

- ① 森 亮一. 皮膚創傷治癒過程における miR-223 の機能解析、第 45 回日本創傷治癒学会、2015 年 11 月 30 日～12 月 1 日、JP タワーホール&カンファレンス (東京都千代田区)
- ② 森 亮一. miR-223 regulates neutrophil activation in the acute inflammatory response during skin wound healing, Gordon Research Conference (Tissue Repair & Regeneration), 7 - 12 June 2015, New London (USA)
- ③ 森 亮一. 組織修復及び炎症制御に関与する microRNA の病態生理学的解析、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

- ④ 森 亮一. Identification of inflammation-related miRNAs in skin wound healing, 2014年11月25日～27日、第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑤ Mori R. Reduced FOXO1 accelerates skin wound healing and attenuates scarring, EMBO Conferences, The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair, 6 - 10 September 2014, Sant Feliu de Guixols (Spain)
- ⑥ Mori R. Pathophysiological role of inflammation-related microRNA in murine skin wound healing, FEBS-EMBO Meeting, 30 August - 4 September 2014, Paris (France)
- ⑦ 森 亮一. 転写因子 FoxO1 の発現抑制は皮膚創傷治癒を促進し癒痕形成を減弱する、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日～26日、広島国際会議場（広島県広島市）
- ⑧ Mori R. Identification of the inflammation-related microRNA in murine skin wound healing using next generation sequencing, The 4th Busan-Nagasaki Joint Seminar on Aging Research, 21 February 2014, Pusan (Korea).
- ⑨ 森 亮一. 皮膚創傷治癒過程における転写因子 FoxO ファミリーの機能解析、2013年12月3日～6日、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
- ⑩ 森 亮一. 老化関連遺伝子及び組織修復の分子相関：寿命制御転写因子 FoxO1 は皮膚創傷治癒及び線維化を制御する、第43回日本創傷治癒学会、2013年11月14日～15日、別府湾ロイヤルホテル（大分県速見郡）
- ⑪ 森 亮一. FoxO1 制御に基づく皮膚創傷治癒薬、2013年10月9日～11日、BIOJapan 2013、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑫ 森 亮一. 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定及び機能解析、第5回日本 RNAi 研究会、2013年8月29日～8月31日、グランドプリンスホテル広島（広島県広島市）
- ⑬ Mori R. The role of transcription factor FoxO family members, and of post-transcriptional regulation by inflammation-related microRNAs, in skin wound healing, Gordon Research Conferences, Tissue repair & regeneration, 16 - 21 June 2013, New London (USA)
- ⑭ 森 亮一. 皮膚創傷治癒改善効果のあるオリゴヌクレオチドの同定及び機能解析、第102回日本病理学会総会、2013年6月6日～8日、ロイトン札幌、札幌芸文館（北海道札幌市）
- ⑮ 森 亮一. 皮膚創傷治癒改善効果のあるオリゴヌクレオチドの同定及び機能解析、第36回日本基礎老化学会総会、2013年6月4日～6日、大阪大学中之島センター（大阪府大阪市）
- ⑯ 森 亮一. 炎症制御を主体とした皮膚創傷治癒に効果のある核酸医薬の作製、BIOtech 2013 in Japan, 2013年5月8日～10日、東京ビッグサイト（東京都江東区）
- ⑰ 森 亮一. 次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡国際会議場・マリメッセ福岡（福岡県福岡市）
- ⑱ 森 亮一. 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定及び機能解析、第42回日本創傷治癒学会、2012年12月2日～4日、かでの2.7（北海道札幌市）
- ⑲ Mori R. Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, The 4th EMBO meeting, 22～25 September 2012, Nice Acropolis (France)
- ⑳ 森 亮一. Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, 第4回日本 RNAi 研究会、2012年8月30日～9月1日、グランドプリンスホテル広島（広島県広島市）
- ㉑ Mori R. Identification of Argonute2-circulating microRNA complexes in blood plasma of calorie-restricted and high fat diet-induced obese mice, International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka - Biology of Aging and Disorders-, 24 - 26 August 2012, Tsukushi Kaikan (Japan)
- ㉒ 森 亮一. 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定及び機能解析、2012年4月26日～28日、第101回日本病理学会総会、京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計3件）

- ① Mori R., Park S, Shimokawa I. Springer, Role of the forkhead box O family and neuropeptide Y in calorie restriction. Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain

Aging (eds., Mori N & Mook-Jung I, 2015, pp. 199-208

- ② 下川 功、森 亮一、化学同人、カロリー制限、老化の生物学 その分子メカニズムから寿命まで (石井 直明 丸山直記 編) 2014、pp. 216-235
- ③ 下川 功、千葉 卓哉、森 亮一、シーエムシー出版、第七章 サーチュインと老化、寿命、レスベラトロールの基礎と応用 (坪田 一男 編)、2012、pp. 66-73

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：創傷または線維症の治療剤

発明者：森 亮一、下川 功

権利者：森 亮一、下川 功

種類：特許

番号：PCT/JP2014/058627

出願年月日：2014 年 3 月 26 日

国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 亮一 (MORI RYOICHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系) ・講師

研究者番号：30509310