

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460217

研究課題名(和文) 分泌型miRNAによる褥瘡・糖尿病性皮膚潰瘍の評価方法の確立と新規治療法への応用

研究課題名(英文) Establishment and application of the new treatment method of evaluation method of pressure ulcers, diabetic skin ulcers by secreted miRNA

研究代表者

藤井 聡 (Fujii, Satoshi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90291228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病に合併する慢性皮膚創傷の浸出液にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9が多量に含まれる。過剰なMMP-9は創傷治癒の遅延や臨床的重症度と関係する。軟膏基剤は薬効を持たない賦形剤と言われてきた。しかし本研究で、基剤のマクロゴールは創面においてMMP-9阻害という薬理作用をもつことを示した。滲出液マイクロRNAのmiR-126の発現は創傷により著明に増減した。低酸素環境が血管内皮細胞由来miRNAと血管内皮機能に与える影響の解析を進め、in vitroの培養細胞の系であるが、miR-126のノックダウン、過剰発現を行いMMP-9や血管新生、血流に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：There was abundant matrix metalloprotease (MMP)-9 in exudate obtained from chronic wounds such as from elderly or diabetes mellitus. Excessive MMP-9 may delay wound healing and correlate with clinical severity. Ointment base has been considered to have no pharmacologic actions. However, in this study macrogol, an ointment base, exhibited pharmacologic activity to reduce MMP-9 activity. The concentration of microRNA, miR-126, varied greatly depending on the characteristics of wound exudate. The effect of hypoxia on endothelial miRNA and function was evaluated using in vitro cell culture system. Knockdown and overexpression of miR-126 were involved in the regulation of MMP-9 in endothelial cells. The results suggested that miR-126 in chronic wound exudates may be involved in angiogenesis and blood flow, affecting the recovery of chronic wounds. The study may provide platform to develop new strategies of therapy against chronic wounds typically seen in elderly or diabetic patients.

研究分野：臨床検査

キーワード：高齢者 皮膚潰瘍 褥瘡 糖尿病 分泌型miRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の褥瘡や糖尿病性潰瘍など皮膚潰瘍は痛みが強く、生活の質を甚だしく低下させる。病態は急性創傷と異なって複雑で個別性が高く評価が難しい。発症・進展には阻血、再灌流障害、機械的変形等が関与し、外用薬、ドレッシング、物理療法などで治療する。しかし症状が進展すると炎症、深い潰瘍と多様な肉芽に至り治療抵抗性となるため、適切な診断と治療が必要である。各々の危険因子の寄与度や治療に対する応答は患者により異なるため、病態を適切に評価する方法が必要となる。

(2) ①近年、病態の診断や予防、治療への反応性や効果などの予測を目的とした各種マーカーの開発が注目され、疾病の予防やオーダーメイド医療への応用が期待される。皮膚障害については分子標的治療薬の副作用やアトピー性皮膚炎のマーカーとしてサイトカイン、ケモカイン等が候補とされてきた。しかしこれらの因子は疾患進展度との間に緩やかな相関がみられるものの評価には不十分である。高齢者の褥瘡・糖尿病性潰瘍の進展・治癒のバイオマーカーは同定されていない。②低分子ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA (microRNA, miRNA) は、標的の遺伝子やタンパク質の発現を微調整することで発生や形態形成、アポトーシス、細胞増殖、生殖機能等の様々な生物学的機能に関与している。近年、エクソソームや微小胞のような小胞顆粒に包埋されて体内を循環する分泌型 miRNA が大きな注目を集めている。分泌型 miRNA は、癌をはじめとした疾患の病態や進行度合いなどの生理状態によってその発現量や種類が大きく変動することが知られ、血液を利用した低侵襲性の診断用バイオマーカーとしての応用が期待されている。炎症期に誘導される miRNA は同定されてきた。しかし、ヒトの褥瘡、糖尿病

性皮膚潰瘍など慢性創傷の治癒過程における分泌型 miRNA の発現動態はまだ明らかにされていない。③高齢者の糖尿病は循環障害、神経障害を介して褥瘡のハイリスクとなる。申請者らは miRNA が褥瘡、糖尿病性皮膚潰瘍発症のマーカーとなり得る可能性に着目し心血管疾患の既往歴を有する患者における血中 miRNA の発現を検討し、特定の miRNA 発現が血糖、血圧、年齢と有意に相関することを見出した。従って、病変局所においても褥瘡・糖尿病性潰瘍の進展・治癒過程の指標となる分泌型 miRNA が存在する可能性は非常に高い。

2. 研究の目的

(1) 褥瘡や糖尿病性皮膚潰瘍は高齢者に高頻度に見られる疾患で、国民医療費の大きな負担となっている。申請者はこれまで、治療に用いる薬剤と潰瘍生体成分の相互作用に着目し、治癒を促進する外用薬の組み合わせを見いだしてきた。しかし多様な病態に適した外用薬の選択は容易ではない。近年、細胞外に放出される分泌型 miRNA が新たな疾患バイオマーカーとして期待されている。本研究では、分泌型 miRNA の測定による褥瘡・皮膚潰瘍の進展・治癒過程の評価系の開発を行う。

(2) 具体的な項目は、①進展・治癒に特異的な分泌型 miRNA の同定と機能解析、②疾患特異的な分泌型 miRNA の効率的な検出条件の確立、③臨床検体における miRNA と皮膚表面の損傷部位(創面)の臨床所見との相関の検討と新規治療法への応用である。

3. 研究の方法

(1) 皮膚組織由来の miRNA は直接臨床検査に応用することは、高齢者には侵襲性が高く現実的ではない。本研究ではより侵襲性が低く簡便に検体を得て診断ができるよう、申請者らが予備的な検討で得た分泌型 miRNA に

焦点を当てて創面浸出液の解析を行う。
miRNA は、リアルタイム PCR 法によりスクリーニングすることで絞り込む。培養細胞を1%低酸素、で刺激した後上清を回収し候補となる miRNA が存在することを確認する。

(2)① リアルタイム PCR 法でより微量の浸出液から効率よく分泌型 miRNA を検出できるよう、臨床で用いられるガーゼの吸水性の検討、浸出液等からの miRNA 抽出法および反応条件を検討する。miRNA は total RNA サンプル全体にわずか 0.01%程度しか存在せず、検出には数 ng の miRNA を要する。したがって、より微量の浸出液を用いて測定するには検出感度の向上が必要である。本研究では、miRNA の抽出・精製法およびリアルタイム PCR 法による反応条件を改良することにより、最終的に浸出液あるいは創面処置に用いたガーゼや浸出液の付着した綿棒から効率よく miRNA の検出を可能にする。②同定した miRNA 分子種を糖尿病や循環器疾患の既往歴を有する褥瘡患者の浸出液より検出し、創面との関連を検討することで、新しい褥瘡の診断や治療モニタリングマーカーとしての可能性を探る。

(3) MMP-9 活性を見る in vitro の評価系を確立する。MMP-9 により分解され呈色する基質を用いて比色法で測定する。マクロゴール軟膏と混合した MMP-9 でウエスタンブロッティングを行う。

4. 研究成果

(1) 褥瘡治療に用いられるガーゼの吸水性に関する研究では臨床現場で用いられるガーゼの吸水性を評価した。ガーゼ 1g あたり 5-6g の吸水が見られた。吸水したガーゼからの水分は 30 分の遠心でおよそ 90%を回収できた。浸出液のタンパク質量は血漿のタンパク質量より少ないため RNA の抽出はより効率的に行いうると推察された。また、リアルタイム PCR 法で微量の浸出液や血液から効率よ

く分泌型 miRNA を検出できるよう抽出法と反応条件を検討した。ヒトで血液 0.5ml あたり数 μg の総 RNA を得られる。miRNA は RNA サンプル全体にわずか 0.01%程度しか存在せず、検出に数 ng の miRNA を必要とする。低酸素環境に暴露した血管内皮細胞株の培養上清中には微量の miRNA が存在するのみであり、微量の浸出液ないし血液を用いて測定するには感度の向上が必要であった。

(2)①分泌型 microRNA の動態について喫煙者で興味深い知見を得た。喫煙者では閉塞性血管炎が発生しやすくその結果虚血性潰瘍をきたしやすい。喫煙者では 8 週間の禁煙により血管機能が回復するとともに末梢血の miR-126 レベルが回復することを明らかにした。禁煙による血圧の低下と miR-126 上昇は血管機能を回復する鍵となる可能性がある。② MMP-9 活性を見る in vitro の評価系でマクロゴール軟膏はクローニングで得た MMP-9 の吸光度を低濃度から低下させ、さらに MMP-9 酵素活性を抑制した。マクロゴール軟膏と混合した MMP-9 でウエスタンブロッティングを行った結果、マクロゴールは MMP-9 の泳動を阻害したのではなく、活性そのものを抑制したことが示唆された。③ 褥瘡浸出液を含んだガーゼから浸出液を回収した。この浸出液から RNA を抽出してリアルタイム RCR を行い miR-126 の発現動態を解析した。浸出液における miR-126 の発現は、褥瘡初期から中期にかけて上昇がみられた。その後は後期に向けて発現が減少する傾向がいずれのサンプルからも得られた。miR-126 の発現の増減は MMP-9 の発現に影響を与え、組織リモデリングに関与していることが考えられる。

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 17 件)

- ① 古田勝経, 溝神文博, 宮川哲也, 森川 拓, 永田 治, 永田 実, 福澤悦子, 油座マミ, 櫻井淳二, 庄司理恵, 藤井 聡. 医師・薬剤師・看護師による褥瘡チーム医療の経済的側面に関する考察, 日本病院・医療管理学会誌 2013; 50: 199-207.
- ② Sugiura T, Dohi Y, Hirowatari Y, Yamashita S, Ohte N, Kimura G, Fujii S. Cigarette Smoking Induces Vascular Damage and Persistent Elevation of Plasma Serotonin Unresponsive to 8 Weeks of Smoking Cessation. *Int J Cardiol* 2013; 166: 748-749.
- ③ Noda Y, Saito M, Watanabe K, Sanagawa A, Sobajima Y, Fujii S. Physicochemical characterization of tretinoin tocoferil emulsion and povidone-iodine sugar ointment blend developed for improved regulation of wound moisture. *Chem Pharm Bull* 2013; 61: 700-705
- ④ Itoh S, Yokoyama R, Kamoshida G, Okada H, Takii T, Tsuji T, Fujii S, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) inhibits blood coagulation by binding to prothrombin and factor Xa via their γ -carboxyglutamic acid (Gla) domain *J Biol Chem* 2013; 288: 21569-21580.
- ⑤ Ito S, Iwaki S, Koike K, Yuda Y, Nagasaki A, Ohkawa R, Yatomi Y, Furumoto T, Tsutsui H, Sobel B, Fujii S. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese subjects and its capacity to increase expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Coronary Artery Disease* 2013; 24: 642-650.
- ⑥ Ito S, Iwaki S, Kondo R, Satoh M, Iwabuchi K, Ohkawa R, Mishima Y, Yatomi Y, Furumoto T, Tsutsui H, Fujii S. TNF- α production in NKT cell hybridoma is regulated by sphingosine-1-phosphate: implications for inflammation in atherosclerosis. *Coronary Artery Disease* 2014; 25: 311-20.
- ⑦ Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Iwaki S, Ito S, Sanagawa A, Ohte N, Fujii S. Circulating level of microRNA-126 may be a potential biomarker for recovery from smoking-related vascular damage in middle-aged habitual smokers. *Int J Cardiol: Heart and Vasculature* 2015; 7: 83-87.
- ⑧ Nobuyuki Sato, Rie Sasaki, Marina Imahashi, Eisuke Ito, Kumiko Saito, Haruyo Kubota, Ahmed Karim Talib, Naka Sakamoto, Kazumi Akasaka, Yasuaki Saijo, Yuichiro Kawamura, Satoshi Fujii, Naoyuki Hasebe. The relationship between repolarization parameters and serum electrolyte levels in patients with J wave syndromes. *Magnesium Research* 2015; 28: 1-13.
- ⑨ 藤井 聡. 動脈硬化性疾患と慢性炎症、血栓症：臨床検査の視点から. *臨床病理* 2015; 63: 605-611.
- ⑩ Suzuki M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi JI, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura M, Kyogashima M, Takahashi T. Targeting CERS6-dependent Metastasis-prone Phenotype in Lung Cancer Cells. *J Clin Invest*. 2016; 126: 254-265.
- ⑪ Satoshi Fujii. PAI-1 in Myocardial Remodeling: Is Pharmacological Suppression by ARB Beneficial? *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 550-551

- ⑫ Sugiura T, Yamashita S, Hirowatari Y, Fujii S, Ohte N. Serotonin in Peripheral Blood Reflects Oxidative Stress and Plays a Crucial Role in Atherosclerosis: Novel Insights toward Holistic Anti-atherothrombotic Strategy. *Atherosclerosis* 2016; 246: 157-160
- ⑬ Mizokami F, Takahashi Y, Hasegawa K, Hattori H, Nishihara K, Endo H, Furuta K, Isogai Z. Pressure ulcers induced by drug administration: A new concept and report of four cases in elderly patients. *J Dermatol.* 2016; 43(4): 436-8. DOI: 10.1111/1346-8138.13093.
- ⑭ Mizokami F, Takahashi Y, Nemoto T, Nagai Y, Tanaka M, Utani A, Furuta K, Isogai Z. Wound fixation for pressure ulcers: a new therapeutic concept based on the physical properties of wounds. *J Tissue Viability.* 2015; 24(1): 35-40. DOI: 10.1016/j.jtv.2015.01.002.
- ⑮ Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. Increased acid ceramidase expression depends on upregulation of androgen-dependent deubiquitinases, USP2, in a human prostate cancer cell line, LNCaP. *J Biochem.* 2015 Oct;158(4):309-19. DOI: 10.1093/jb/mvv039.
- ⑯ Tagami T, Yanai H, Terada Y, Ozeki T. Evaluation of Phosphatidylserine-Specific Peptide-Conjugated Liposomes Using a Model System of Malaria-Infected Erythrocytes. *Biol Pharm Bull.* 2015; 38(10): 1649-51. DOI: 10.1248/bpb.b15-00310.
- ⑰ Tagami T, Kubota M, Ozeki T. Effective Remote Loading of Doxorubicin into DPPC/Ploxamer 188 Hybrid Liposome to Retain Thermosensitive Property and the Assessment of Carrier-Based Acute Cytotoxicity for Pulmonary Administration. *J Pharm Sci.* 2015; 104(11): 3824-32. DOI: 10.1002/jps.24593.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Yamamura S, Iwaki S, Sanagawa A, Fujii S. The Expression Of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Is Post-transcriptionally Regulated By Sphingosine-1-phosphate And SERPINE1 mRNA binding protein. The XXIVth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013年7月2日, Amsterdam (Netherlands).
- ② 野田康弘、藤井 聡. ブレンド軟膏 (ユーパスタとオルセノン軟膏) の吸水性、ヨウ素の放出性および展延性 第 15 回日本褥瘡学会 2013年7月19日, 神戸
- ③ Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Ohte N, Hirowatari Y, Ito S, Iwaki S, Fujii S. Smoking-Induced Vascular Damage is Associated With Decreased Circulating MicroRNA-126 and Persistent Elevation of Plasma Serotonin. Scientific Session of the American Heart Association. 2013年11月18日, Dallas(USA)
- ④ Sanagawa A, Iwaki S, Asai M, Sakakibara D, Norimoto H, Fujii S. HIF-1 α /HuR Pathway Regulates the Increased Expression of PAI-1 Induced by Sphingosine 1-phosphate in HepG2 Cells Rendered Hypoxic: A Novel Linkage between Thrombosis and Hypoxia. Scientific Session of the American Heart Association. 2013年11月19日, Dallas(USA)
- ⑤ 高橋朋弘, 田上辰秋, 岩城壮一朗, 藤井 聡, 尾関哲也. 善玉コレステロール模倣

製剤の開発および ApoE 欠損マウスに対する有用性の評価 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 29 日, 熊本

- ⑥ 真川明将、野田康弘、磯貝善蔵、小林孝志、藤井 聡. マクロゴールがアルカリホスファターゼとマトリックスメタロプロテアーゼ-9 に与える影響の解析. 第 16 回日本褥瘡学会総会 2014 年 8 月 29-30 日, 名古屋
- ⑦ Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Iwaki S, Sanagawa A, Ogasawara M, Fujii S, Ohte N. Blood Pressure Reduction and Increase of Circulating MicroRNA-126 Indicate Improvement of Vascular Endothelial Damage after Smoking Cessation Intervention in Middle-aged Habitual Smokers. 87th American Heart Association Scientific Session, 2014 年 11 月 16 日, Chicago (USA).
- ⑧ 藤井 聡、齊藤美加、真川明将、野田康弘、磯貝善蔵、古田勝経. 褥瘡治療に用いられるブレンド軟膏の吸水性と展延性に関する研究. 第 14 回日本褥瘡学会北海道地方会 2015 年 3 月 14 日, 札幌
- ⑨ 藤井 聡, 小笠原美沙, 岩城壮一郎. 低酸素環境が血管内皮細胞由来 miRNA と血管内皮機能に与える影響の解析. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015 年 5 月 22 日, 甲府.
- ⑩ Satoshi Fujii, Misa Ogasawara, Soichiro Iwaki. Hypoxia Induces Dysregulation of miR-126 Affects VEGF and MMP-9 Expression in Endothelial Cells. 2015 Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2015 年 6 月 22 日, Toronto(Canada)
- ⑪ 野田康弘、藤井 聡. マクロゴール軟膏によるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 活性の阻害様式に関する検討. 第 17 回日本褥瘡学会 2015 年 8 月 29 日, 仙台

- ⑫ 杉浦知範、土肥靖明、山下純世、藤井 聡、廣渡祐史、大手信之. 心血管危険因子を有する患者における血液中セロトニン濃度と酸化ストレスの関連. 日本心臓病学会 2015 年 9 月 20 日, 横浜
- ⑬ 浅井大知、山下啓司、藤井 聡、野田康弘. 側鎖にアシル基を持つ PEO を用いた新規軟膏基剤の開発. 第 35 回褥瘡研究会 2016 年 2 月 2 日, 名古屋

[図書] (計 1 件)

- ① 藤井 聡. 日本臨床社、miRNA (マイクロ RNA, microRNA) 臨床高血圧学 別冊 日本臨床 2014, 72:218-221 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 聡 (FUJII, Satoshi)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90291228

(2)研究分担者

尾関 哲也 (OZEKI, Tetsuya)
名古屋市立大学・薬学研究科・教授
研究者番号：60277259

磯貝 善蔵 (ISOGAI, Zenzou)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・その他部局・その他
研究者番号：20285208

岩城壮一郎 (IWAKI, Soichiro)
名古屋市立大学・薬学研究科・講師
研究者番号：60399962