

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861503

研究課題名(和文)炎症性miRNAの時空間的機能解析に資するバイオイメージング技術の開発及び応用

研究課題名(英文)Development and application of bioimaging technology to contribute to the spatiotemporal and functional analysis in inflammatory miRNA

研究代表者

田中 克弥(TANAKA, Katsuya)

長崎大学・病院(医学系)・医員

研究者番号：70722750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、皮膚創傷部位における炎症細胞の空間的動態が組織修復機構(癒傷形成)に影響を及ぼす組織・分子的相関性の解明を目的として行われた。特に、近年多彩な機能を有することで注目を集めているmicroRNA(miRNA)に着目し、創傷治癒と関係の深い炎症に関連するmiRNAを同定することに成功した。さらにmiRNA遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、生体イメージング装置などを用いて解析を進めることで、自然免疫の中心となる好中球の貪食能・感染制御機能に影響していることを解明した。この過程で用いたイメージング技術には、共焦点蛍光顕微鏡を用いた解析も多く、広く世界に利用される技術となり得る。

研究成果の概要(英文)：This study has been performed to elucidate the organizational and molecular correlation influencing on tissue repair mechanism including scar formation by spatiotemporal dynamics of inflammatory cells at skin wound. And we achieved to identify the skin wound inflammation-related microRNA(miRNA) which was noted having various functions. Furthermore, we produced the miRNA knockout mice and revealed that the one of inflammation-related miRNA affected the phagocytosis and infection control function of neutrophils having a central role in innate immunity by using bioimaging technique. The imaging techniques used in this study that employed a confocal fluorescent microscope can be a technique that is widely used in the world.

研究分野：医歯薬学

キーワード：miRNA 炎症 イメージング 皮膚創傷治癒 炎症細胞

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚創傷治癒過程は、炎症細胞を主体とする「炎症期」、肉芽組織が構築される「増殖期」、過剰に生産された細胞外基質が分解される「成熟期」の3つの段階に分類される。そして創治癒後には癒痕形成(傷跡)を残して組織修復過程が終了する。これまでに、様々なモデル生物を用いた研究において、皮膚創傷治癒に限っては炎症反応が必ずしも必要では無く、逆に癒痕化を導く増悪因子にもなり得るといった報告がなされている。しかしその分子メカニズムははっきりしていない。

遺伝子発現制御は、転写、mRNA 分解、翻訳、蛋白質分解の4段階で構成されている。microRNA (miRNA) は、標的 mRNA に作用して mRNA の分解及び蛋白質翻訳抑制に働いていることが分かっており、近年、この miRNA の機能解析が注目を集めている。miRNA は全身至る所に存在し、多くの機能を有しており、創傷治癒においてもいくつかの miRNA が機能していることが分かっている。特に炎症期に係わる miRNA として、我々がこれまでに行った研究から miR-142 の存在が明らかとなった。ただし miR-142 が創傷治癒における炎症に対し、どのような機序での働きを有しているかは明らかとはなっていない。

創部における治癒機構は、細胞や組織が時間的に相互作用することでおこなわれる。この三次元的な解析を行うためには、*in vivo* ライブイメージの技術が必要と思われる。しかしこれまでの研究では、ショウジョウバエやゼブラフィッシュなどがモデルとして利用されてきているが、いずれも下等モデル生物であるため、この技術のほ乳類への応用が期待されている。

### 2. 研究の目的

上記背景を鑑みて、本研究では皮膚創傷部位における炎症細胞の空間的動態が組織修復機構(癒痕形成)に影響を及ぼす組織・分子的相関性の解明を目的として行われた。また時空間的な機構解明において必要となるイメージング技術の開発も必要と有り、この技術開発及び応用を目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) <モデルマウスの作製>

まず初めに皮膚創傷治癒の炎症期において発現が認められた miR-142 の遺伝子欠損(KO)マウスを作製した。

続いて Lysozyme M (LysM) プロモーター下に EGFP を発現させたトランスジェニックマウスと miR-142 KO マウスを交配させ、LysM-EGFP/miR-142 KO マウスを作製した。LysM-EGFP マウスとは、好中球及びマクロファージに EGFP が選択的に発現しているマウスである。これにより、miR-142 KO マウス

の中で、好中球・マクロファージが EGFP の発現によって発光するマウスを作製した。

#### (2) <マウス創傷治癒実験>

このように作製したマウスの背部に、直径4mmの生検トレパン(カイイングストリーズ株式会社製)を用いて皮膚全層欠損創を作製した。実験には全て生後6~12週齢のマウスを使用した。またその際、麻酔下に背部の毛をバリカンで剃毛してから行った。(図1)



傷の肉眼的評価には、デジタルカメラで条件を揃えて撮影した。撮影した写真から、創部の面積を PhotoshopCS4 (Adobe Systems, San Jose, CA)を用いて測定・比較した。

また組織学的評価のための傷採取には、直径6mmの生検トレパン(カイイングストリーズ株式会社製)を使用し、創周囲の皮膚を含めて皮膚全層で採取した。

#### (3) <感染創実験モデル>

皮膚感染創モデルに用いた黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)) 株は、National Institute of Technology and Evaluation (Tokyo, Japan) から入手した (NBRC 100910)。

皮膚感染創モデルでは、マウス背部に作製した皮膚全層欠損創一つに対して、 $1.0 \times 10^8$  CFU/10  $\mu$ L の *S. aureus* を播種した。

創部に残存した *S. aureus* の定量は、生検トレパンによって採取した組織から DNA 精製を行い、*S. aureus* のプライマー (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いてリアルタイム PCR 法 (ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster, CA)) で行った。

本研究では、より日常に近い形での感染創モデルを作製したいとの考えから、直接創部に細菌を播種するのではなく、同ケージ内に上記感染創モデルマウスを飼育することで生じる水平感染創モデルを作製した。飼育に用いたケージは、縦17cm、横30cm、高さ13cmで、1匹の野生型(WT)マウスを通常の感染創モデルとして飼育し、同時に背部に皮膚全層欠損創を作製したWTマウス、KOマウスを各1匹ずつ飼育した。そして3日間飼育した後に創を採取して残存している *S. aureus* を定量した。

#### (4) <炎症細胞の採取・解析>

続いて、炎症細胞（好中球、マクロファージ、Tリンパ球、Bリンパ球）の機能を解明するため、MicroBead Kit (Miltenyi Biotech Inc., Bergisch Gladbach, Germany)を用いて皮膚創傷部、および骨髄から細胞を分離した。各炎症細胞のマーカ―としては、好中球に anti-Ly-6G 抗体、マクロファージに anti-CD11b 抗体、Tリンパ球に anti-CD4 抗体、Bリンパ球に anti-B220 抗体を使用した。採取した炎症細胞は、miRNA もしくは totalRNA の精製や、phagocytosis assay、chemotaxis assay、F-アクチン染色や免疫染色、ウエスタンブロッティングに使用した。

採取した組織のホモジナイズには TissueLyserII (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。そして miRNA および totalRNA の抽出・精製には、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) 及び RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) を使用した。また miRNA に特化した qPCR を行うために、miRCURY LNA microRNA PCR system (Exiqon, Vedbaek, Denmark) と、gene-specific primer sets (Takara Bio, Shiga, Japan) を使用した。そして qPCR は ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を用いて行った。

#### (5) <組織学的解析>

組織の固定には 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を使用した。in situ hybridization を行う際には、凍結切片を作製した為、包埋に O.C.T Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) を使用した。H&E 染色などの通常の染色には、6 μm 厚の組織切片を用いて行った。

皮膚創傷部の透明化には、Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis (CUBIC)、SeedB の 2 つの方法を用いた。透明化した組織に、好中球、マクロファージの蛍光免疫染色、及びトマトレクチンによる毛細血管の染色を行い、共焦点顕微鏡 (Nikon C2) やライトシート顕微鏡 (ZEISS) を用いて観察した。

### 4. 研究成果

(1) <黄色ブドウ球菌による皮膚感染創において、miR-142 KO マウスでは創治癒遅延を認める>

皮膚創傷治癒における炎症期に高発現を認めていた miR-142 であるが、無菌的な創傷治癒においては、WT マウスと miR-142 KO マウスの間には創治癒に有意な違いを認めなかった。そこで炎症期に集まる細胞の一つで、自然免疫に大きく係わる好中球に注目し、感染状態での創傷治癒に影響があるか検討した。前述の方法で創感染モデルを作製し、WT マウスと miR-142 KO マウスを比較したとこ

ろ、miR-142 KO マウスにおいて明らかな創治癒遅延を認めた。(図2)

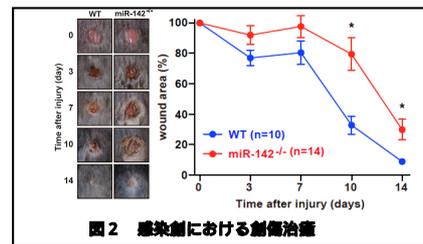


図2 感染創における創傷治癒

(2) <miR-142 は好中球において形態的・機能的に働き、細菌排除に係わっている>

miR-142 が感染制御に係わっていることが予想されたため、創部に残存している細菌の量にも違いが出ていると考え、S.aureus の DNA を精製し、PCR で測定した。すると WT マウスの創部に比べ、miR-142 KO マウスの創部に残存した S.aureus の量は、約 3.6 倍と多く残存していることが分かった。またより臨床に近い感染状態として、接触感染状態（水平感染モデル）を作製した。水平感染状態下では、miR-142 KO マウスの創部に残存していた S.aureus は WT マウスの約 2.5 倍であった。

そこで自然免疫の中心的役割を持っている好中球に着目し解析を行った。LysM-EGFP マウスと各マウスを掛け合わせたマウスを用いて同様の感染創を作製した。LysM-EGFP マウスは創部に集積してきた好中球が蛍光を持っているため、これを IVIS Imaging system (住商ファーマインターナショナル株式会社) を利用して in vivo で解析を行ったところ、創作成後 24 時間後の時点で、非感染創では集積している好中球に差を認めなかったのに対し、感染創では miR-142 KO マウスの方が集積している好中球が少ないことが判明した。

背部感染創を組織学的に観察したところ、miR-142 KO マウスの創部では、好中球の S.aureus 貪食能が低下していることが分かった。

これを in vitro で検証するために、マウスの骨髄から好中球を分離し、S.aureus や走化性刺激因子による反応を比較した。すると、miR-142 KO マウスの好中球は走化性に異常を認めた。また顕微鏡で細胞を観察したところ、刺激を受けた後の細胞形態に変化を認めため、細胞骨格の異常を疑い F-actin の染色をし、これを超解像顕微鏡で観察した。すると、刺激前の状態では細胞形態に違いは認めなかったが、染色法に問題は無く今後の解析に大きく役立つ方法が確立できた。(図3)

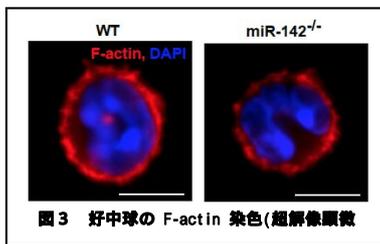


図3 好中球の F-actin 染色(超解像顕微鏡)

(3) <創部組織の透明化に成功した>

超解像顕微鏡は限られた施設にしか設置されていないため、日常的に誰でも解析できるわけではない。組織診断学としては多くの施設に設置されている共焦点顕微鏡での解析が一般的である。この共焦点顕微鏡を用いて組織の三次元的解析が行えるようになることを目指して皮膚創部組織の透明化に取り組んだ。透明化の方法にはいくつかの報告がなされているが、本研究ではSCALEとSeeDBの2つの方法に取り組んだ。それぞれサンプル作成にかかる時間や見え方に一長一短があるが、いずれの方法でも組織の透明化には成功した。(図4)

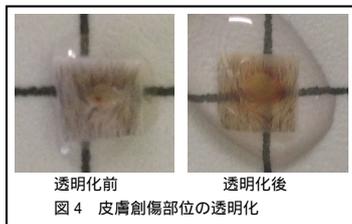


図4 皮膚創傷部位の透明化

しかし3次元的な解析を行うための精度の高い染色がうまくいかなかったため、構成された画像は粗く、今後の課題として、EGFPマウスを用いることで、炎症細胞の発色をはっきりさせ、血管や周囲組織との管形成を観察できるようにしていきたいと考えている。

#### 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0件)

[学会発表](計7件)

田中 克弥、創傷治癒における miR-142 の機能解析、第27回長崎障害者支援再生医療研究会、2015年12月8日、長崎大学医学部 良順会館(長崎)

田中 克弥、miR-142 は皮膚創部における黄色ブドウ球菌感染防御に必須である、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・KITTE(東京)

Tanaka Katsuya, Functions of miR-142 in skin wound healing: regulation of the hematopoiesis system and tissue repair. Gordon Research Conferences, Tissue repair & regeneration, June 7-12.2015, Boston (USA)

田中 克弥、炎症関連 microRNA のマウス皮膚創傷治癒における病態生理学的役割、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、パシフィコ横浜(神奈川)

田中 克弥、Solitary fibrous tumor の3例、第32回日本頭蓋顎顔面外科学会・学術集会、2014年11月6日、大阪市中央公会堂(大阪)

Tanaka Katsuya, Pathophysiological role of inflammation-related microRNA in murine skin wound healing. EMBO conference The Molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair, Sep 6-10. 2014, Sant Feliu de Guixols (Spain)

田中 克弥、非固着性コンタクトレイヤーの創傷における有用性~臨床研究を通じて~、第57回日本形成外科学会総会・学術集会、2014年4月9-11日、長崎ブリックホール(長崎)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

無

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 克弥 (TANAKA Katsuya)

長崎大学・病院(医学系)・医員

研究者番号: 70722750

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無