

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	組織修復における瘢痕抑制性microRNAの同定と意義
別タイトル	Novel Role of microRNA146b 5p for Scar less Healing in Skin Wounds
作成者（著者）	赤坂, 喜清
公開者	東邦大学医学会
発行日	2022.03.01
ISSN	00408670
掲載情報	東邦医学会雑誌. 69(1). p.34 38.
資料種別	学術雑誌論文
内容記述	最終講義
著者版フラグ	publisher
JaLDOI	info:doi/10.14994/tohoigaku.2022 007
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD62766891

組織修復における癒痕抑制性 microRNA の同定と意義

赤坂 喜清^{1,2)}

¹⁾東邦大学医学部病理学講座

²⁾東邦大学大学院医学研究科先端医科学研究センター推進研究部門組織修復・病態制御学研究室

要約：bFGF 投与した皮膚傷痕における癒痕抑制に microRNA (miRNA) の関与を想定し、bFGF で処理した線維芽細胞を網羅的に解析し、miRNA146b-5p を選定した。miRNA146b-5 はラット PDGFR α を標的化して PDGFR α の発現を抑制する。ラット皮膚潰瘍に miRNA146b-5 mimic を投与すると 7 日目の開放創面積と 10 日目の癒痕面積が有意に減少した。逆に inhibitor 投与では 7 と 10 日目の開放創面積と 10 日目の癒痕面積の有意に増加した。miRNA146b-5 発現細胞は創部の脂肪細胞周囲に多数認められた。さらに脂肪組織の間質細胞に miRNA146b-5 と Exosome marker CD81 の共発現が確認された。この間質細胞は主に線維芽細胞であり、Exosome を介して miRNA146b-5 を取り込んだ脂肪組織の間質細胞が miRNA146b-5 の標的細胞であることが明らかとなった。この過程で miRNA146b-5 は脂肪組織の間質細胞における PDGFR α の発現抑制し、その線維化能を低下させることで癒痕を抑制していることが示唆された。

東邦医学会誌 69(1) : 34-38, 2022

索引用語：皮膚, microRNA, PDGFR α , 癒痕抑制, 脂肪組織

序 論

創傷治癒は、原始人が狩猟で負った傷をいかに治すかということから始まった、太古から継続している学問である。この創傷治癒は、炎症期、増殖期と癒痕期が連続的に進行して終了する。炎症期が消退すると増殖期に移行し、増殖期では増生した肉芽組織が次第に減少し最後には癒痕期に移行する。この連続的に進行する過程で異なる修復細胞の規則正しい発現消失が繰り返され、最終的に細胞成分が殆ど無い癒痕が形成される。しかしながら修復細胞の発現消失による癒痕形成のメカニズムは未だ不明である。

四半世紀前に創傷治癒に重要なサイトカインが同定され、創傷治癒学は大きく進歩した。このサイトカインのうち、我々は塩基性線維芽細胞増殖因子 (Basic fibroblast growth factor : bFGF) に注目し、動物実験とヒト臨床治験から bFGF による受傷皮膚の傷痕における癒痕抑制を報告してきた¹⁻³⁾。このメカニズムとして bFGF 投与した皮膚創部から癒痕抑制に有効な分子が誘導され、線維化促進分子の発現を抑制すると仮定した。近年、bFGF で誘導

される癒痕抑制分子の候補として非翻訳 RNA の microRNA (miRNA) が想定されてきた⁴⁾。そこで、bFGF 投与による癒痕線維化を抑制する miRNA を明らかにするため、bFGF 処理後の皮膚創部由来の線維芽細胞 (WGFs) を網羅的に解析した。

PDGFR α は、多くの臓器で線維化を促進することが報告されている⁵⁻⁷⁾。本研究では網羅的解析から選定された miRNA146b-5p が、血小板由来成長因子受容体 α (Platelet-derived growth factor receptor α : PDGFR α) を標的にすることを証明した。さらに、miRNA146b-5p は皮膚創部で PDGFR α の発現を抑制することで癒痕線維化を著しく抑制することを明らかにした。従来報告では、皮膚創部の線維化を実行する筋線維芽細胞は脂肪細胞の起源が示唆されている⁸⁾。岩山らは、PDGFR α が脂肪細胞の前駆細胞を筋線維芽細胞に変化させ、皮膚創部の線維化を促進することを示した⁹⁾。そこで今回の癒痕線維化の抑制メカニズムとして、miRNA146b-5p による脂肪組織細胞における PDGFR α 発現抑制から皮膚創部の癒痕線維化の抑制機序を考察した。

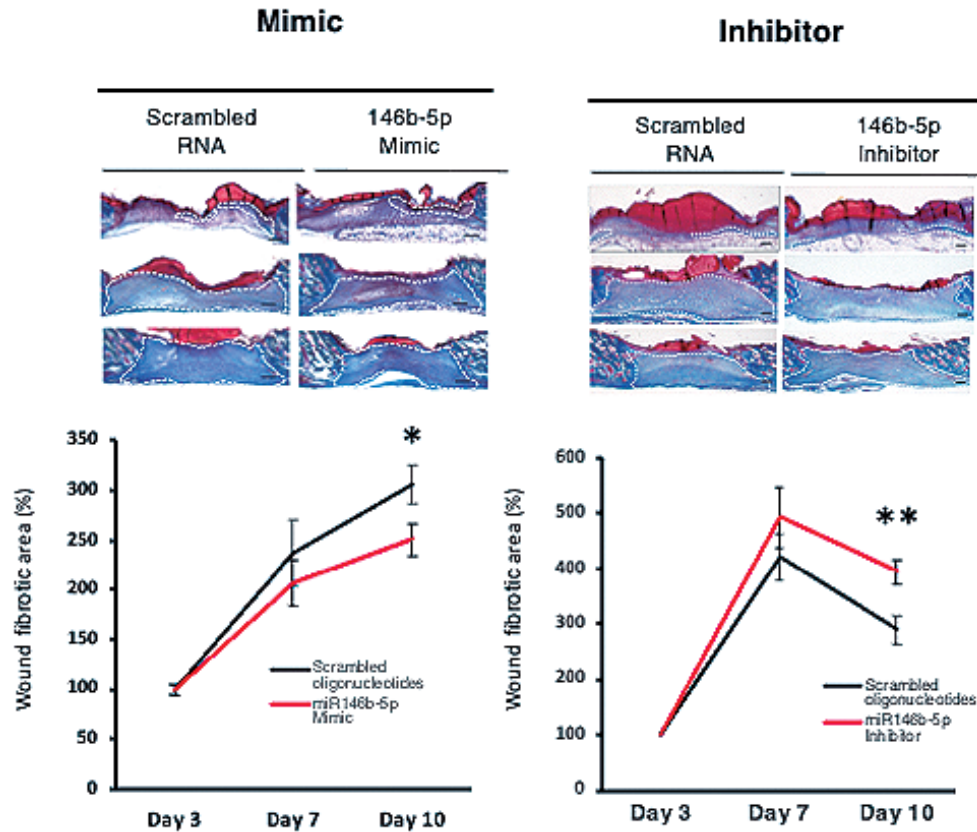


Fig. 1 miRNA146b-5p treatment attenuates fibrosis in skin wounds. The upper panel shows representative images of Mallory-Azan-stained wounds treated with miRNA146b-5p mimic (left), miRNA146b-5p inhibitor (right), or scrambled RNA. Mallory-Azan positively-stained fibrotic areas surrounded by white dashed lines were measured by NIH image. The lower panel shows the proportion of fibrotic area on day 10 was significantly smaller in miRNA146b-5p mimic-treated wounds than in scrambled RNA-treated wounds (left). In contrast, the proportion of fibrotic area on day 10 in miRNA146b-5p inhibitor-treated wounds was significantly larger than in scrambled RNA-treated wounds (right). Data are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. scrambled RNA-treated control wounds by an unpaired Student's t test.

Y. Akasaka *et al.* The role for miRNA146b-5p in the attenuation of dermal fibrosis and angiogenesis by targeting PDGFR α in skin wounds (<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.11.037>) より許可を得て転載

結 果

1. miRNA146b-5p の選定

WGF の PCR アレイ解析から、bFGF 処理 48 と 96 時間目でもともに発現上昇する miRNA146b-5p を選定した。WGF のノーザンブロット解析から、bFGF 処理後 96 時間まで miRNA146b-5p の発現増加が確認された。よって WGF において bFGF は miRNA146b-5p の発現を誘導することが認められた。またラット皮膚創部の PCR 分析から、bFGF 投与 3 日および 5 日目で miRNA146b-5p の発現増加が確認された。

In situ hybridization と免疫組織化学の二重染色^{10,11)}から、皮膚創部における miRNA146b-5p の発現細胞を検討した。その結果、miRNA146b-5p の発現細胞は prolyl 4-

hydroxylase (P4H) 陽性の線維芽細胞で発現していたが、 α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性の筋線維芽細胞では発現がなかった。

2. PDGFR α は miRNA146b-5p の標的分子

ヒト造血細胞において PDGFR α が miRNA146b-5p の標的分子であるという報告¹²⁾から、ラット PDGFR α が miRNA146b-5p の直接標的であることを検討した。バイオインフォーマティック検索から、PDGFR α 3'-UTR に miRNA146b-5p の結合部位の候補を 2 箇所選定した。これらの部位における miRNA146b-5p によるルシフェラーゼ活性低下を認めたことから miRNA146b-5p の翻訳異常による PDGFR α の発現低下を確認した。タンパク質レベルでも、miRNA146b-5p inhibitor あるいは mimic を導入した WGF では、PDGFR α タンパク質発現の増加と減少

miR146b-5p/CD81/DAPI

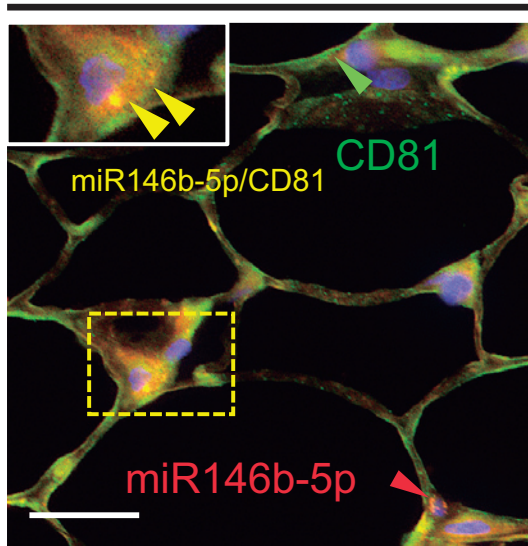


Fig. 2 CD81 exosomes containing miRNA146b-5p in adipose tissue cells. Combined staining with miRNA146b-5p (red) and CD81 (green). High-power view of the area indicated by the yellow dashed line box. Yellow arrowheads highlight double-positive granules for CD81 and miRNA146b-5p in the adipose tissue cells of mimic-transfected wounds. Scale bars: 20 μ m.

Y. Akasaka *et al.* The role for miRNA146b-5p in the attenuation of dermal fibrosis and angiogenesis by targeting PDGFR α in skin wounds (<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.11.037>) より許可を得て転載

がそれぞれ確認できた。よって PDGFR α は miRNA146b-5p の標的分子であることが確認できた。

皮膚潰瘍の可視化解析からラット皮膚創部における miRNA146b-5p と標的 PDGFR α との関係を検討した。PDGFR α 陽性細胞では miRNA146b-5p の発現が無く、PDGFR β 陽性細胞には miRNA146b-5p の発現がみられた。よってラット皮膚創部において PDGFR α は miRNA146b-5p の標的分子であり、ヒト造血細胞同様に miRNA146b-5p は PDGFR α の発現抑制から PDGFR α による線維化能を有意に抑制可能と考えられた。

3. miRNA146b-5p による癒痕線維化抑制と標的細胞

miRNA146b-5p の癒痕抑制能を *in vivo* で検証するため miRNA146b-5p の投与実験を行った。miRNA146b-5p と同様の構造を有する mimic をラット皮膚潰瘍に投与すると投与 7 日目で開放創面積の有意な減少を認めた。逆に inhibitor 投与では投与 7 日および 10 日目で開放創面積の有意な増加を認めたので miRNA146b-5p による創閉鎖の促進能が示された。miRNA146b-5 投与による皮膚潰瘍の癒痕線維化を検討すると、miRNA146b-5p mimic 投与により

Cutaneous adipose tissues

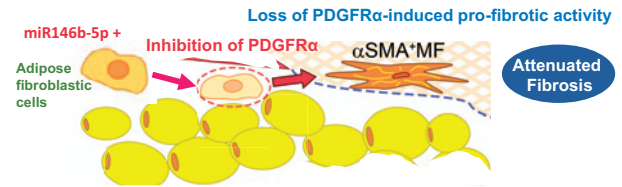


Fig. 3 miRNA146b-5p attenuates skin wound fibrosis: miRNA146b-5p-targeted repression of PDGFR α in adipose fibroblastic cells could result in a loss of their PDGFR α -induced profibrotic activities, leading to a reduction in fibrosis in skin wounds. MF, myofibroblast; SMA, smooth muscle actin.

Y. Akasaka *et al.* The role for miRNA146b-5p in the attenuation of dermal fibrosis and angiogenesis by targeting PDGFR α in skin wounds (<https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.11.037>) より許可を得て転載

10 日目の癒痕線維化の面積の有意な減少が確認された。逆に miRNA146b-5p inhibitor 投与では 10 日目の癒痕線維化の面積が有意に増加した。よって miRNA146b-5p は、皮膚創部の閉鎖を促進し癒痕線維化を抑制することが明らかとなった (Fig. 1)。

miRNA146b-5p の標的細胞を検討した。mimic 投与した皮膚創部の脂肪組織では CD81 陽性 Exosome と miRNA146b-5p が発現しており、これ以外の組織では CD81 発現は認められなかった。さらに CD81 Exosome と miRNA146b-5p の二重染色から、CD81 と miRNA146b-5p の共発現が脂肪組織の間質細胞に認められた (Fig. 2)。さらに脂肪組織の FSP1 陽性または P4H 陽性の線維芽細胞に miRNA146b-5p 発現が認められたが、S100 陽性脂肪細胞では認められなかった。

考 察

皮膚創部の脂肪組織の線維芽細胞に CD81 陽性 Exosome と miRNA146b-5p の共発現が確認された。よって線維芽細胞は CD81 陽性 Exosome を介して miRNA146b-5p を特異的に取り込んでおり、miRNA146b-5p の主要な標的細胞は脂肪組織の線維芽細胞と考えられた。創部の CD68 陽性マクロファージは CD81 陽性 Exosome と miRNA146b-5p を発現していた。最近の研究では単球由来の Exosome により間葉系幹細胞の骨形成遺伝子の発現増強が報告されている¹³⁾。したがって、CD68 陽性マクロファージは miRNA146b-5p を含む CD81 陽性 Exosome を遊離し、この Exosome を介して脂肪組織の線維芽細胞に取り込まれた miRNA146b-5p が線維芽細胞の PDGFR α の発現抑制に関与していると考えられた。これまで PDGFR α は脂肪前駆細胞に発現することが報告されている^{14,15)}。Ue-

zumiらは骨格筋線維化でPDGFR α が線維芽細胞・脂肪細胞の前駆細胞の重要なマーカーであることを報告している¹⁶⁾。Shookらはマウス皮膚創部において、脂肪細胞由来の細胞が筋線維芽細胞に分化して線維化を促進することを報告している¹⁷⁾。またLiaoらは、miRNA146b-5pが心臓リモデリングにおいて線維芽細胞からこれらの細胞から筋線維芽細胞への分化抑制することを報告している¹⁸⁾。これらの知見を総合的に考慮して、miRNA146b-5pは、線維細胞・脂肪細胞の前駆細胞において発現するPDGFR α の発現を抑制し、筋線維芽細胞への分化抑制により筋線維芽細胞による癒痕線維化が抑制されることで、皮膚創部の癒痕線維化が抑制されることが示唆された (Fig. 3)。Shookらは内臓脂肪症候群 (Metabolic syndrome) で過剰に肥大した脂肪組織では、脂肪組織細胞から筋線維芽細胞への分化が障害され、侵襲を受けた際に脂肪組織の修復が遅延することを示唆している¹⁷⁾。この過程でmiRNA146b-5pを投与することで侵襲を受けた脂肪組織の癒痕線維化が抑制され修復能の改善の可能性が示唆された。

TAKE-HOME MESSAGES

miRNA146b-5pは

1. 皮膚創部でPDGFR α による癒痕線維化能を抑制することで傷痕を減少させる。
2. PDGFR α 発現抑制から脂肪組織による癒痕線維化能を抑制させ傷痕を小さくする。
3. 直接投与により障害を受けた臓器で生じる癒痕線維化を抑制することが期待される。

本研究はJSPS科研費JP17K11555, 19K10017と20K09854の助成を受けた。また本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業S1101016とS1411015の助成を受けた。

本研究遂行にあたり多大な尽力いただいた東邦大学医学部病理学講座の三上哲夫教授と医局員の先生方、病院病理学講座の渋谷和俊教授と高橋啓教授、研究推進室の藤澤千恵先生と形成外科学講座の大西清教授、荻野晶弘教授と医局員の先生方に感謝の意を表します。

Conflicts of interest : 開示すべき conflict of interest (COI) はない。

文 献

- 1) Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, Jimbow K, Ishii T. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. *J Pathol.* 2004; 203: 710-20.
- 2) Ono I, Akasaka Y, Kikuchi R, Sakemoto A, Kamiya T, Yamashita

- T, et al. Basic fibroblast growth factor reduces scar formation in acute incisional wounds. *Wound Repair Regen.* 2007; 15: 617-23.
- 3) Shi HX, Lin C, Lin BB, Wang ZG, Zhang HY, Wu FZ, et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013; 8: e59966.
- 4) Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Fibroblast growth factor 2 as an antifibrotic: antagonism of myofibroblast differentiation and suppression of pro-fibrotic gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017; 38: 49-58.
- 5) Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 255-73.
- 6) Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018; 62: 44-62.
- 7) Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009; 16: 303-13.
- 8) Ebmeier S, Horsley V. Origin of fibrosing cells in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2015; 27: 555-62.
- 9) Iwayama T, Steele C, Yao L, Dozmorov MG, Karamichos D, Wren JD, et al. PDGFR α signaling drives adipose tissue fibrosis by targeting progenitor cell plasticity. *Genes Dev.* 2015; 29: 1106-19.
- 10) Schneider M, Andersen DC, Silahatoglu A, Lyngbæk S, Kauppinen S, Hansen JL, et al. Cell-specific detection of microRNA expression during cardiomyogenesis by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Mol Histol.* 2011; 42: 289-99.
- 11) Nielsen BS, Holmström K. Combined microRNA in situ hybridization and immunohistochemical detection of protein markers. *Methods Mol Biol.* 2013; 986: 353-65.
- 12) Zhai PF, Wang F, Su R, Lin HS, Jiang CL, Yang GH, et al. The regulatory roles of microRNA-146b-5p and its target platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRA) in erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *J Biol Chem.* 2014; 289: 22600-13.
- 13) Ekström K, Omar O, Granéli C, Wang X, Vazirisani F, Thomsen P. Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013; 8: e75227.
- 14) Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25: 273-83.
- 15) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2010; 12: 143-52.
- 16) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, et al. Identification and characterization of PDGFR α +mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1186.
- 17) Shook BA, Wasko RR, Mano O, Rutenberg-Schoenberg M, Rudolph MC, Zirak B, et al. Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair. *Cell Stem Cell.* 2020; 26: 880-95.e6.
- 18) Liao Y, Li H, Cao H, Dong Y, Gao L, Liu Z, et al. Therapeutic silencing miRNA146b-5p improves cardiac remodeling in a porcine model of myocardial infarction by modulating the wound reparative phenotype. *Protein Cell.* 2021; 12: 194-212.

Novel Role of miRNA146b-5p for Scar-less Healing in Skin Wounds

Yoshikiyo Akasaka^{1,2)}

¹⁾Department of Pathology, Toho University School of Medicine

²⁾Division of Research Promotion and Development, Advanced Research Center,
Toho University Graduate School of Medicine

We found that miRNA146b-5p was preferentially upregulated in wound fibroblasts by bFGF and identified PDGFR α as a direct target of miRNA146b-5p. miRNA146b-5p treatment of skin wounds led to markedly repressed fibrosis, whereas miRNA146b-5p inhibitor treatment markedly promoted fibrosis, with increased expression of PDGFR α and collagen I levels in wounds. These results indicate the positive effects of miRNA146b-5p for the suppression of fibrosis, possibly through the inhibition of PDGFR α *in vivo*. Notably, we discovered the specific colocalization of the exosome marker CD81 and miRNA146b-5p in the fibroblastic cells of adipose tissues following mimic transfection. Therefore, fibroblastic cells of adipose tissues, which may specifically pick up and contain miRNA146b-5p via exosome following transfection, may play an important role in the suppression of dermal fibrosis. In this process, miRNA146b-5p may inhibit PDGFR α expression in fibro-adipogenic progenitors, which will lead to the inhibition of wound fibrosis via repression of PDGFR α -induced profibrotic activities with myofibroblast transition.

J Med Soc Toho 69 (1): 34-38, 2022

KEYWORDS: skin, microRNA, PDGFR α , scar-less healing, adipose tissues