

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09749

研究課題名(和文) miR-628による自然免疫を介した眼表面炎症制御機構の解明と新規治療法への応用

研究課題名(英文) Regulation of Ocular Surface Inflammation by miR-628 via Innate Immunity and Its Application to Novel Therapeutic Methods

研究代表者

上田 真由美 (MAYUMI, Ueta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60398386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、難治性眼表面疾患患者の血液を用いた血漿miRNA解析を行い、血漿miR628-3pが健常人と比較して患者の血漿で、有意に上昇していることを明らかとした。また、ヒト単球細胞株に、miR628-3pを強制発現させ網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、miR628-3pを強制発現させた単核球では、ウイルス由来の2本鎖RNAの受容体であるTLR3、MDA5、RIG-Iを初めとする自然免疫関連遺伝子の発現が有意に抑制されていた。患者の血清で有意に上昇しているmiR628-3pが、自然免疫関連遺伝子を負に制御していることより、病態に自然免疫応答の調整機構の異常が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性眼表面炎症疾患の病態・病因の理解、特にmiRNAを介した自然免疫制御の破綻の病態への関与を示している。特に miR-628-3p による自然免疫制御の機構を明らかにしており、難治性眼表面炎症疾患への miR-628-3p などのmiRNAやTLR3、MDA5、RIG-Iなどの自然免疫関連分子をターゲットにした新規治療法の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：We performed plasma miRNA analysis using blood samples from patients with refractory ocular surface diseases and found that plasma miR628-3p was significantly up-regulated in patients' plasma compared to healthy controls. Comprehensive gene expression analysis of human monocyte cell lines with forced expression of miR628-3p showed that the expression of innate immunity-related genes, including TLR3, MDA5 and RIG-I, which are receptors for virus-derived double-stranded RNA, was significantly suppressed in mononuclear cells with forced miR628-3p expression. The expression of TLR3, MDA5, RIG-I and other innate immunity-related genes was significantly suppressed. The miR628-3p, which is significantly elevated in the patient's serum, negatively regulates innate immune-related genes, suggesting that the pathology may involve an abnormal regulation mechanism of the innate immune response.

研究分野：眼科

キーワード：miRNA 自然免疫 眼表面炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

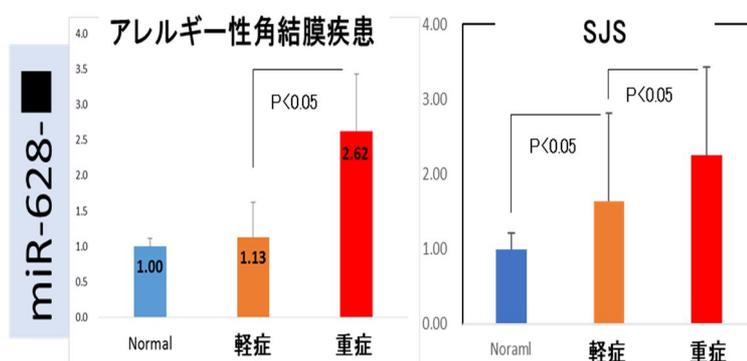
1. 研究開始当初の背景

眼表面炎症疾患には様々な疾患が含まれる。代表的なものとしては、アレルギー性角結膜疾患があげられる。一方、大変まれではあるが、重篤な視力障害を生じる Stevens-Johnson 症候群 (SJS) も眼科領域において解決しなくてはならない重要な眼表面炎症疾患である。

アレルギー性角結膜疾患においても SJS においても、その重症度は様々であり、眼表面炎症やそれに伴う眼病変の重症度を規定する因子については、よくわかっていない。

申請者らは、SJS のバイオマーカーを探索する目的で、血漿を用いた網羅的 miRNA 解析を行い、miR-628 が有意に上昇していることを見出した。また、眼表面病態の重症度別 (軽症、重症) において miR-628 がどのような動態を示すか解析したところ、眼表面病態が重症である症例において血漿中 miR-628 が有意に高値を示すことも明らかとしている (下図)。

さらに、同じ眼表面炎症疾患であるアレルギー性角結膜疾患での miR-628 の動態を解析してみたところ、重症アレルギー性角結膜疾患患者において、軽症、あるいは、健常コントロールと比較して、miR-628 が有意に高値を示すことを見出した。

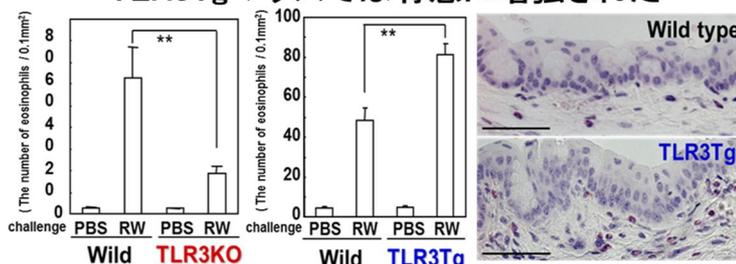


このように申請者は、“miR-628 が眼表面炎症病態の重症度と大きく関与している”ことが明らかとした。つまり、血漿中の miR-628 を測定することにより、眼表面病態の重症度の把握が可能となり、個々の病態に合った適切な治療を推奨することが可能となることを示唆している。

一方、申請者は、長年、眼表面炎症における自然免疫の役割について解析し、眼表面炎症の制御に、自然免疫関連受容体である Toll like receptor 3 (TLR3) が重要な役割を示すことを明らかとしてきた。

具体的には、眼表面上皮に、TLR3 が強く発現し、TLR3 のリガンドにより炎症性サイトカインやアレルギー関連サイトカインが著明に発現誘導されることを報告している。

眼表面炎症はTLR3KOマウスでは有意に抑制され、TLR3Tgマウスでは有意に増強された



さらには、TLR3 遺伝子改変マウスを用いた解析により、TLR3 を欠損したマウスでは眼表面炎症が有意に抑制され、TLR3 を過剰発現したマウスでは眼表面炎症が有意に増強されることを見出し、TLR3 が眼表面炎症を正に制御していることを明らかとしている(上図)。

2 . 研究の目的

このように、研究課題の核心をなす学術的「問い」は、“miRNA はどのようなメカニズムによって眼表面炎症を制御しているか? ”、そして“miRNA が自然免疫をどのように制御しているのか?”であり、本問を解明することにより、miRNA を標的とした新規治療法の開発につながる事が期待されるとともに、またよくわかっていない miRNA の機能を自然免疫制御の観点から大きく進展させることが期待できる。

miRNA については、様々な疾患、特に癌領域について、発症予測バイオマーカーとしての有用性が複数報告されているが、眼表面疾患についての報告は少ない。さらに、今までの報告は、バイオマーカーとしての可能性の報告がほとんどであり炎症制御機構についての報告はさらに少ない。

申請者が着目する miR-628 についてはさらに報告が少なく、炎症制御解析についての報告は皆無である。このように、miR-628 に着目した眼表面炎症制御機構の解明は、本研究が世界で初めてと考えられる。また、眼表面における miRNA を介した自然免疫制御についての報告は皆無であり本研究が初めてとなる。

3 . 研究の方法

本研究では、miR-628 による自然免疫を介した眼表面炎症制御機構の解明とバイオマーカーの探索、ならびに、新規治療法開発への応用を目的に下記を実施する
免疫細胞における miR-628 機能の解析

miR-628が眼表面炎症疾患患者の血漿中で有意に増加していることより、血液中に含まれる白血球における機能を解析する。具体的には、THP-1等の白血球系の細胞株に、miR-628 のmimicを遺伝子導入して、miR-628を増加させ（眼表面炎症疾患患者の状態を再現）、網羅的遺伝子発現解析を行い、どのような遺伝子群の動態が変化するかを明らかとする。これにより、miR-628がどのような遺伝子群を制御することにより眼表面炎症制御に関わっているか明らかとなる事が期待できる。

眼表面局所における miR-628 機能の解析

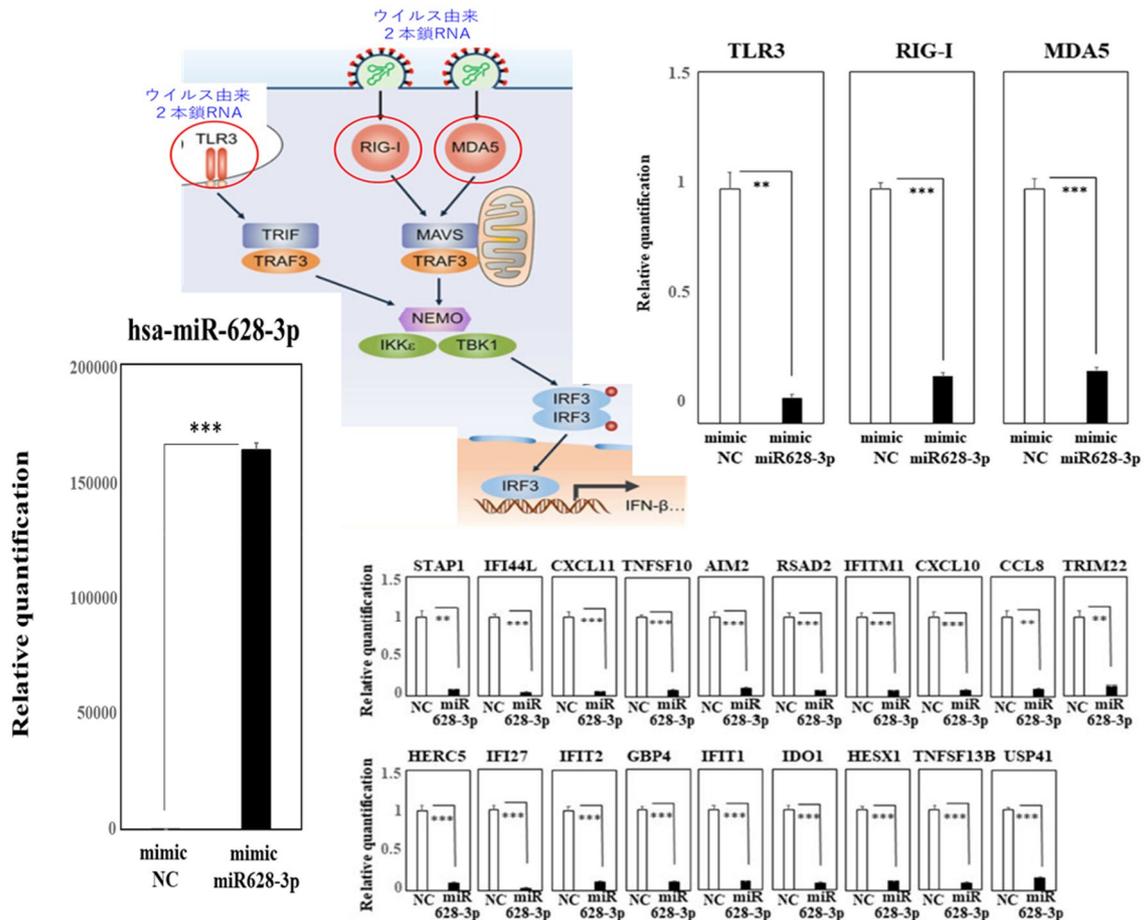
慢性期SJSや重症アレルギー性角結膜疾患等の眼表面炎症疾患患者の多くは、眼局所での炎症が最も強い場合が多い。そのため、眼局所におけるmiR-628機能を解析する。結膜上皮にmiR-628のmimicを遺伝子導入して、miR-628を増加させ網羅的遺伝子発現解析を行い、どのような遺伝子群の動態が変化するかを明らかとする。これにより、眼表面局所において

miR-628がどのような遺伝子群を制御するか明らかとなることが期待できる。

上記で明らかとなったmiR-628により制御される遺伝子の発現を、眼表面炎症性疾患患者の単核球を用いてその遺伝子発現を、コントロールと比較する。これにより、実際に、miR-628がどのように眼正面炎症の病態にかかわっているか明らかとなることが期待できる。

4. 研究成果

我々は、難治性眼表面疾患である慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者や、重症アトピー性角結膜炎患者の血液を用いた血漿 miRNA 解析を行った。その結果、血漿 miR628-3p が健常人と比較して難治性眼表面疾患患者の血漿で、有意に上昇していることを明らかとした。また、ヒト単核細胞株に、miR628-3p を強制発現させ網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、miR628-3p を強制発現させた単核球では、ウイルス由来の2本鎖RNAの受容体であるTLR3、MDA5、RIG-Iならびに、STAP1, IFI44L, CXCL11, TNFSF10, AIM2, RSAD2, IFITM1, CXCL10, CCL8, TRIM22, HERC5, IFI27, IFIT2, GBP4, IFIT1, IDO1, HESX1, TNFSF13B, USP41 を初めとする自然免疫関連遺伝子の発現が有意に抑制されていた。これらの遺伝子の有意な発現抑制については、定量RT-PCRでも確認できた。難治性眼表面疾患患者の血清で有意に上昇しているmiR628-3pが、TLR3を初めとした自然免疫関連遺伝子を負に制御していることより、難治性眼表面疾患患者の血清の病態に自然免疫応答の調整機構の異常が関与している可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aziza Yulia, Harada Kohei, Ueta Mayumi, Fukuoka Hideki, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie	4. 巻 26
2. 論文標題 Challenges in the management of bilateral eyelid closure in Stevens-Johnson Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101473 ~ 101473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2022.101473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Aziza Yulia, Itoi Motohiro, Ueta Mayumi, Inatomi Tsutomu, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie	4. 巻 48
2. 論文標題 Limbal-Rigid Contact Lens Wear for the Treatment of Ocular Surface Disorders: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 313 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICL.0000000000000924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sunaga Yuma, others, Ueta Mayumi, Sotozono Chie, et al	4. 巻 107
2. 論文標題 Risk factors for sepsis and effects of pretreatment with systemic steroid therapy for underlying condition in SJS/TEN patients: Results of a nationwide cross-sectional survey in 489 Japanese patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 75 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueta Mayumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Susceptibility Genes and HLA for Cold Medicine-Related SJS/TEN with SOC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 912478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.912478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueta Mayumi, Nishigaki Hiromi, Komai Seitaro, Mizushima Katsura, Tamagawa-Mineoka Risa, Naito Yuji, Katoh Norito, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Positive regulation of innate immune response by miRNA-let-7a-5p	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1025539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.1025539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueta Mayumi, Nishigaki Hiromi, Mizushima Katsura, Naito Yuji, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulation of innate immune response by miR-628-3p upregulated in the plasma of Stevens-Johnson syndrome patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Ocular Surface	6. 最初と最後の頁 174 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtos.2021.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Seitaro Komai, Katsura Mizushima, Yuji Naito, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita.
2. 発表標題 Positive regulation of innate immune response by miRNA, let-7a-5p, which upregulated in plasma of both Atopic dermatitis with/without Atopic keratoconjunctivitis
3. 学会等名 European Academy of Allergy & Clinical Immunology (EAACI) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 MAYUMI UETA
2. 発表標題 Regulation of ocular surface inflammation by innate immunity
3. 学会等名 the 8th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田真由美、西垣裕美、水島かつら、内藤裕二、外園千恵、木下茂
2. 発表標題 アトピー性角結膜炎患者血漿で上昇するhsa-let-7a-5pによる自然免疫応答制御
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayumi Ueta
2. 発表標題 Genetics of Stevens-Johnson syndrome
3. 学会等名 GERSO (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayumi Ueta ¹ , Hiromi Nishigaki ¹ , Seitaro Komai ¹ , Katsura Mizushima ² , Yuji Naito ² , Chie Sotozono ¹ , Shigeru Kinoshita ³
2. 発表標題 Comprehensive miRNA analysis of plasma in Atopic dermatitis with/without Atopic keratoconjunctivitis
3. 学会等名 AAO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Katsura Mizushima, Yuji Naito, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita
2. 発表標題 Regulation of innate immune response by miR-628-3p
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------