

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791873

研究課題名(和文) マイクロRNAを標的とした難治性網膜ぶどう膜炎の炎症制御の可能性

研究課題名(英文) Analysis of miRNA signatures in eyes with EAU in rat

研究代表者

渡邊 交世 (Aatanabe, Takayo)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90458901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：18-25塩基からなるmicroRNA (miRNA)が標的mRNAの発現を制御することで生命現象の制御に関与していることが報告されている。本課題ではヒト難治性ぶどう膜炎の動物モデルである自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)を誘導し、眼局所でのmiRNAの発現について解析を行ったところ、免疫前(day 0)に比較して免疫後14日目ではmiR-223、miR-146aなど炎症制御に関与することが予想されるmiRNAの発現上昇がみられた。EAUの臨床経過に並行して、網膜におけるmiRNAの発現の上昇、低下がみられたことから、これらのmiRNAがEAUの病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Micro-RNAs (miRNAs) are non-coding, 21-24 nucleotide long RNAs that have recently emerged as important posttranscriptional regulators of gene expression. In the present study, we investigated the changes of miRNA expression of retina during the development of EAU in rats. Inflammation in anterior segment by biomicroscopic evaluation peaked on day 14. The expression of IL-1beta and MCP-1 in aqueous humor from eyes with EAU peaked on day 14. Microarray analysis demonstrated that the expression of miR-223, 142, 21, and 146 in retina was elevated on day 14 than on day 0 (baseline), and the expression of these miRNAs declined on day 21, whereas the expression of miR-181, 183, 124, and 331 was reduced on day 14. These results were confirmed by qRT-PCR method. The changes of miRNA expression paralleled clinical course of EAU in rat. These findings suggest that these up-regulated or down-regulated miRNAs may contribute to the development and regulation of EAU in rat.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：ぶどう膜炎 microRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、蛋白質の翻訳に関与しない non-coding RNA が存在し、その中でも 18-25 塩基からなる microRNA (miRNA) が標的 mRNA の発現を制御することで発生・分化などの様々な生命現象の制御、また悪性腫瘍の分化・進展にも関与していることが明らかとなってきた (Bartel DP. Cell 116:281-97, 2004, Lu et al. Nature 435:834-38, 2005)。さらに最近では免疫制御に関わる miRNA の研究が進み、Toll-like receptor (TLR) を中心とした自然免疫の制御やリンパ球の分化・成熟にも重要な役割を果たす miRNA もいくつか同定されるようになった (O'Connell et al. Nat Rev Immunol 10:111-22, 2010)。

申請者はこれまでぶどう膜炎の病態解明を目的に、ヒトぶどう膜炎の動物モデルとして広く利用されている実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) を用いて、ぶどう膜炎の発症、進行のメカニズムについて研究を行ってきた。最近、我々はラットを用いた EAU 炎症極期において代表的な pro-inflammatory cytokine である TNF- α の前房水中濃度がピークを示すこと、また TLR のリガンドであり新しい炎症誘導分子として近年注目されている High Mobility Group Box (HMGB)-1 も TNF- α と同様に炎症極期の前房水中において急激に増加することを見いだした (Watanabe et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:2283-90, 2009.)。

近年 TNF- α や IL-6 を中心とした自然免疫系を促進する miRNA、一方で TLR を介した炎症経路を抑制的に制御する miRNA の存在が指摘されていることから、網膜ぶどう膜炎の眼局所においても miRNA の発現の上昇、低下が生じ EAU の病態を促進、制御している可能性が考えられる。実際にマウスの EAU において臨床経過とともに特定の miRNA の発現が上昇・低下していることが報告されており、miRNA の発現とぶどう膜炎の病態との関連が指摘されている (Ishida et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:611-7, 2011)。

2. 研究の目的

EAU の発症期、炎症極期、炎症消退期で特異的に発現が上昇、低下している miRNA をマイクロアレイによる網羅的な解析手法を用いて同定、同時に各病期におけるサイトカインやケモカインの発現を測定することで miRNA

と既知の炎症メディエーターとの関連について解析をする。本研究課題では non-coding RNA の視点から難治性ぶどう膜炎における microRNA を標的分子とした炎症制御の可能性について検討することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1) EAU の誘導

既報 (Watanabe T et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:2283-90, 2009) に準じて網膜抗原の一種である IRBP の部分ペプチド R14 (5ug) を完全フロイントアジュバント (CFA) と 1:1 に混和した乳液をリスラットの皮下に接種し、EAU を誘導した。

(2) EAU の重症度の評価

免疫後 0 日目 (免疫直前)、7 日目 (発症前)、14 日目 (炎症極期)、21 日目 (炎症消退期) にスリットランプを用いて前眼部炎症の重症度をスコア化した。同日ラットを屠殺後、眼球を摘出、ホルマリン固定、HE 切片を作成し、病理組織学的な評価を行った。

(3) 前房水、後眼部における炎症性サイトカイン、ケモカインの発現の検討

免疫後 0、7、14、21 日目で前房水を採取し、前房水中の IL-1 β 、MCP-1 について ELISA 法にて測定した。同日に眼球を摘出し、眼球を前眼部と後眼部に分離、後眼部をホモジェネートし、その上清中の IL-1 β 、MCP-1 発現を ELISA 法にて測定した。サイトカイン、ケモカインの変動と各種 microRNA との発現の相関について検討した。

(4) 網膜の採取、RNA の抽出、microRNA マイクロアレイ解析

免疫後 0 日目 (免疫直前)、7 日目 (発症前)、14 日目 (炎症極期)、21 日目 (炎症消退期) でラットを屠殺、眼球を前眼部と後眼部に分離、網膜を採取し、microRNA の発現解析に用いた。採取した網膜からトータル RNA を抽出、吸光度系にて収量を確認した。採取したトータル RNA を用いて miRCURY LNATM microRNA Array による網羅的な発現解析を行った。

(5) 定量 PCR による microRNA の発現の確認

4) において発現の上昇、低下のみられた microRNA について定量 PCR 法 (Applied Biosystems 社、TaqMan[®] MicroRNA Assay) を用

いて発現の確認を行った。

(6) microRNA の局在の確認

(4)において発現の上昇、低下のみられた microRNA が眼組織のどの部位に局在しているのか In Situ Hybridization (ISH) の手法を用いて発現部位を検討した。プローブには Exiqon 社製の DIG-probe を使用した。内部コントロールの miRNA として U6 を選択した。

4. 研究成果

(1) EAU の臨床経過と眼内サイトカイン、ケモカインの変動の検討

細隙灯顕微鏡検査にて抗原免疫後7日目には EAU はみられなかったものの14日目に前眼部炎症のピークを示し、21日目には軽減した。病理組織学的な検索でも免疫後14日目において硝子体内や網膜下への炎症細胞の著明な浸潤、網膜外層の破壊が観察され、21日目には炎症細胞の浸潤は認められなかった。さらにEAUの各病期での前房水中のサイトカイン(IL-1 β)、ケモカイン(MCP-1)の発現を検討したところ、いずれもぶどう膜炎の炎症極期である免疫14日目でピークを示し、21日目に低下した。後眼部組織の上清中のIL-1 β 、MCP-1も前房水と同様の挙動を示した。

(2) マイクロアレイを用いたEAU眼局所におけるmiRNAの網羅的な発現解析

MicroRNA の発現について miRCURY LNATM microRNA Array を用いて網羅的な発現解析を行ったところ、免疫前と比較して網膜におけるmiRNA の発現が上昇(免疫直前と比較して発現比が2倍以上)した遺伝子数は免疫後7、14、21日目でそれぞれ0個、10個、9個、低下(免疫直前と比較して発現比が1/2以下)した遺伝子数は0個、4個、0個であった。免疫前(day 0)に比較して、免疫後14日目ではmiR-223、miR-142-5p、miR-21、miR-146aなどのmiRNAの発現上昇がみられた。免疫後21日目においてもこれらのmiRNAの発現上昇が維持されていた。一方、発現の低下したmiRNAにはmiRNA-181a、183、124、331が含まれていた。

(3) 定量PCRを用いたmiRNAの発現解析の検討

発現の変動のみられたmiRNAの中で、特に

発現の変動が著明であったmiR-223について定量PCRを行ったところ、免疫後7日目では発現はみられず、14日目で発現が急激に上昇し、21日目には急速に発現が低下した。miR-146についてもmiR-223とほぼ同様の発現パターンを示した。

(4) ISH法によるmicroRNAの局在の確認
U6に対するプローブを用いてISHを施行したところ、正常網膜の内層部にU6陽性の所見が確認された。現在、miR146に対するprobeを用いてmir146の局在について解析中である。

考案

今回、発現が上昇していたmiRNAの中でmiRNA146はTLRs-NF- κ Bを抑制的に制御するmiRNAとして近年注目されており(PNAS, 103;12481-86, 2006, J Exp Med, 208;1189-1201, 2011)、EAU極期の網膜で発現上昇したmiRNA-146aが眼炎症に対するregulatoryなmicroRNAとして炎症制御に関与している可能性が示唆される。またmiRNA-223やmi-21は脳梗塞の動物モデルにおいて発現が増加し、これらのmiRNAを過剰発現することで神経保護効果が得られることが報告されている(PNAS, 2012, FEBS journal 2010)。

一方で発現の低下した4つのmiRNAにはmiRNA-181a、183、124、331が含まれていた。特にmiRNA-124はマクロファージに遺伝子導入することでMHC class II、CD11b、CD86、TNF- α の発現が著明に低下、一方でTGF- β の発現が上昇することが報告されており(Nat Med, 2011 17: 64-71)、眼局所においてmiRNA-124の発現を維持、または増加することでEAUの軽症化に繋がることを期待される。以上の結果より、眼局所にて発現の変動がみられたいくつかのmiRNAがEAUの病態の進行・制御に関与している可能性が示唆された。

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)(以下全て査読あり)

[雑誌論文](計4件)

1. 渡辺交世、松木奈央子、柳沼重晴、永本敏之 先天白内障の角膜乱視
日本眼科学会雑誌 2014;108:98-103.

2. Hirukawa K, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical

coherence tomography of the choroid in new-onset acute posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013;251:2273-2275. doi: 10.1007/s00417-013-2265-z.

3. Taki W, Keino H, Watanabe T, Okada AA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in recurrent unilateral posterior scleritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013;251:1003-1004. doi: 10.1007/s00417-012-1972-1.

4. Nakayama M, Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W, Inoue M, Hirakata A. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Retina. 2012;32:2061-2069. doi: 10.1097/IAE.0b013e318256205a.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 慶野博、中島史絵、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ . 杏林アイセンターにおける小児および若年者のぶどう膜炎の統計 第67回日本臨床眼科学会 2013年10月31日-11月3日 横浜

2. 渡邊交世、慶野博、瀧和歌子、越前成旭、肥留川京子、岡田アナベルあやめ 網膜中心静脈閉塞症から抗リン脂質抗体症候群の診断に至った一例 第47回日本眼炎症学会 2013年7月12日-13日 大阪

3. 慶野博、渡辺交世、宮東昭彦、川上速人、岡田アナベルあやめ 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)における眼局所のmicroRNAの発現 第47回日本眼炎症学会 2013年7月12日-13日 大阪

4. Takayo Watanabe, Kyoko Hirukawa, Hiroshi Keino, Wakako Taki, Nariaki Echizen, Annabelle A. Okada Clinical characteristics of patients diagnosed with presumed diabetic iritis IOIS meeting

2013年2月27日-3月1日 Valencia Spain

5. 慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ EDI-OCT を用いた交感性眼炎回復期の脈絡膜厚の評価 第66回日本臨床眼科学会 2012年10月25-28日 京都

6. 肥留川京子、慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、平形明人、岡田アナベルあやめ 網膜動静脈閉塞症に対してステロイドパルス療法が奏功したSLE網膜症の1例 第46回日本眼炎症学会 2012年7月14日-16日 横浜

7. 慶野博、渡辺交世、瀧和歌子、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ長期投与ベージェット病患者の蛍光眼底造影の推移 第46回日本眼炎症学会 2012年7月14日-16日 横浜

8. 渡辺交世、慶野博、瀧和歌子、越前成旭、岡田アナベルあやめ インフリキシマブ治療を導入した若年性ベージェット病ぶどう膜網膜炎の2症例 第116回日本眼科学会総会 2012年4月5日-8日 東京

〔図書〕(計 2 件)

1. 渡邊交世 眼科疾患最新の治療2013-2015 梅毒、結核 p238 南江堂 2013年6月15日発行

2. 渡邊交世 眼科疾患ビジュアルブック Chapter 9 水晶体疾患 p149-156 学研メディカル秀潤社 2013年4月5日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 交世 (Watanabe, Takayo)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：90458901

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：