

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462697

研究課題名(和文)眼炎症疾患におけるmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文)Role of microRNA in intraocular inflammation

研究代表者

渡邊 交世(Takayo, Watanabe)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：90458901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではぶどう膜炎におけるmicroRNA(miRNA)の作用について検討するためヒトぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)、エンドトキシン誘導実験的ぶどう膜炎(EIU)を用いてmiRNAの発現を比較・検討した。その結果、EAUとEIUの両方の炎症極期の眼局所にてmiRNA-146b、223などの発現が共通して上昇、一方でmiRNA-124などのmiRNAの発現が共通して低下しており、病態の異なるぶどう膜炎において共通のmiRNAがぶどう膜炎の病態制御に関与している可能性が示唆された。本結果からmiRNAを介した新しい治療法の開発へと繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Our recent study showed that the expression of Micro-RNA(miRNA)-223, 142, 21, and 146 in retina was elevated, whereas the expression of miRNA-181, 183, 124, and 331 was reduced during development of experimental autoimmune uveoretinitis(EAU). The present study demonstrated increased expression of miRNA-223 and 146 in inner nuclear layer and inflammatory cells infiltrating in into retina using In Situ Hybridization. Furthermore, we investigated the changes of miRNA expression of iris/ciliary body of endotoxin induced uveitis(EIU) in rats. The number of cells infiltrating into aqueous humor peaked at 12 hours after injection of lipopolysaccharide(LPS). Microarray analysis demonstrated that the expression of miRNA-146, 155, 21, and 221 was increased at 12 hours, whereas the expression of miRNA-499, 124, and 539 was reduced at 12 hours. These findings suggest that these up-regulated or down-regulated miRNAs may play roles for development and regulation of EIU as well as EAU.

研究分野：眼炎症

キーワード：ぶどう膜炎

1. 研究開始当初の背景

近年、蛋白質の翻訳に関与しない機能性 non-coding RNA が存在し、その中でも 21-23 ヌクレオチドの 1 本鎖 RNA である microRNA (miRNA) が標的 mRNA の発現を制御することで発生・分化、悪性腫瘍の分化・進展、血管新生などに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, Kerscher A et al. Nat Rev Cancer 6:259-69, 2006)。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 (Rebane et al. J Allergy Clin Immunol. 132:15-26, 2013)。

ぶどう膜炎の領域においても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) をマウスに誘導、EAU の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)。

最近、我々は EAU をルイスラットに誘導し、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 miRNA-223、miRNA-146a など炎症制御に関与することが予想される miRNA の発現が上昇し、一方で miRNA-181 など炎症抑制作用を有する miRNA の発現が低下していることを確認しており、これらの miRNA が EAU の病態の進行・制御に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、ぶどう膜炎における miRNA の作用について検討するため実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) における miRNA の発現の局在を In Situ Hybridization (ISH) の手法を用いて検討、またエンドトキシン誘導実験的ぶどう膜炎 (EIU) を用いて EIU 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行う。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 miRNA とぶどう膜炎の病態との

関連について検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EAU における miRNA の発現部位の検討

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 に混和した乳液をルイスラットの皮下に接種し、EAU を誘導した。

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。

microRNA の局在の確認

マイクロアレイの結果から、EAU の眼局所おで発現の上昇、低下のみられた microRNA の局在について検討するため In Situ Hybridization (ISH) の手法を用いて検討した。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。

(2) EIU における miRNA の発現解析

EIU の誘導

既報 (Ohta K et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:744-750, 2002) に従い、6週令のルイスラット足底皮下に lipopolysaccharide (LPS) 200ug/0.1ml 生食水を投与し、EIU を誘導した。

EIU の重症度の評価

LPS 投与直前、LPS 投与 6、12、24 時間後の前房水を採取し前房水中へ浸潤した炎症細胞数を測定、また眼球摘出後、病理標本を作成し細胞浸潤の程度について組織学的に検討した。

前房水中の炎症性サイトカインの発現の検討

LPS 投与直前、LPS 投与 6、12、24 時間後の前房水を採取し前房水中の炎症性サイトカイン (IL-1b、IL-6) を ELISA 法にて測定した。上記サイトカインの変動と各種 microRNA との発現の関連について検討した。

虹彩・毛様体の採取、RNA の抽出、microRNA マイクロアレイ解析

LPS 投与直前、6、12、24 時間後にラットを屠殺、眼球を前眼部と後眼部に分離、虹彩毛様体を採取し、microRNA の発現解析に用いた。採取した虹彩・毛様体からトータル 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 GeneChip miRNA 4.0 Array による網羅的な発現解析を行った。

TaqMan microRNA Array Cards を用いた miRNA 発現の評価

と同様に LPS 投与直前、12 時間後にラットを屠殺、眼球を前眼部と後眼部に分離、虹彩毛様体を採取、TaqMan microRNA Array Cards (Applied Biosystems 社、TaqMan®MicroRNA Assay) を用いて miRNA の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) EAU における microRNA の局在の検討
マイクロアレイ、および定量 PCR の結果から EAU の炎症極期である免後 14 日目で発現の上昇がみられた miRNA-223、miRNA-146a について In Situ Hybridization (ISH) の手法を用いて検討したところ、無処置ラット、および EAU 誘導ラットの網膜内顆粒層に miRNA-223、miRNA-146a 陽性の所見がみられた。さらに EAU 誘導ラットの網膜内に浸潤した炎症細胞にも miRNA-223、miRNA-146a 陽性を示す細胞が存在することを報告した (Watanabe et al. Br J ophthalmol 100:425-31, 2016)。一方、発現の低下した miRNA の中で miRNA-181a の局在を検討したところ、無処置ラット、および EAU 誘導ラットの網膜内顆粒層に陽性所見がみられた (Watanabe et al. Br J ophthalmol 100:425-31, 2016)。

miRNA-223 は myeloid 系細胞に高発現しており好中球の分化誘導・活性化の制御、M2 マクロファージへの誘導を促進することが知られている (Johnnidis et al. Nature 451:1125-29, 2008, Essandohet al. Shock 46:122-31, 2016)。また miRNA-146a は Toll-like Receptor4 (TLR4) の細胞内シグナル分子を標的とし、LPS による炎症反応に対して抑制作用を有することが報告されている (Taganov et al. Proc Natl Acad Sci USA 103:12481-6, 2006)。EAU 炎症極期の眼局所で発現上昇した miRNA-223 が作用することでぶどう膜炎の消退に関与している可能性が示唆された。

一方、miRNA-181a は ISH にて無処置ラット、および EAU 誘導ラットの網膜内顆粒層に陽

性所見が観察されたが、免疫後から発現の減少がみられた。最近の報告では miRNA-181 が TNF-a を標的として抗炎症作用を有することが報告されており (Li et al. PLoS ONE 8:e71568, 2013)、眼内において miRNA-181 が炎症制御分子として眼の免疫特権の維持に関与している可能性が考えられた。

(2) EIU の臨床経過と眼内サイトカインの変動の検討

LPS 投与直前、LPS投与6、12、24 時間後の前房水を採取し前房水中へ浸潤した炎症細胞数を測定したところ6時間後から細胞の浸潤がみられ、12時間後にピークを示し24時間後には減少した。また眼球摘出後、病理組織標本を作成、検討したところ、LPS投与12、24時間後において前房中、および虹彩実質に好中球を主体として細胞浸潤がみられた。

さらに EIU を発症したラット前房水中のサイトカイン (IL-1b、IL-6) の発現を検討したところ、いずれも前房水中の細胞数と同様に LPS投与12時間後にピークを示し、24時間後に低下した。

(3) EIU 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 GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて網羅的な発現解析を行ったところ、LPS 投与前と比較して虹彩・毛様体における miRNA の発現が上昇 (LPS 投与直前と比較して発現比が 2 倍以上) した遺伝子数は LPS 投与後 6、12、24 時間でそれぞれ 21 個、18 個、17 個、低下 (LPS 投与直前と比較して発現比が 1/2 以下) した遺伝子数は 14 個、27 個、24 個であった。LPS 投与前に比較して、LPS 投与 12 時間後では miR-146b、miR-155、miR-221 などの miRNA の発現上昇がみられた。24 時間後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、LPS 投与 12 時間後発現の低下した miRNA には miRNA-499、124、539 が含まれており、24 時間後において miRNA-124 の発現低下が持続していた。

(4) TaqMan microRNA Array Cards を用いた定量 PCR による miRNA の発現解析

2)と同様に LPS 投与直前、12 時間後にラットを屠殺、眼球を前眼部と後眼部に分離、虹彩毛様体を採取し TaqMan microRNA Array Cards を用いて miRNA の発現解析を行った。その結果、マイクロアレイの結果で発現上昇のみられた miRNA-146b、miRNA-155、

miRNA-223 が Array Cards による定量 PCR でも発現上昇がみられた。一方でマイクロアレイの結果で発現低下がみられた miRNA-124 が Array Cards の結果でも LPS 投与前に比べ発現の低下が確認された。

EAU の眼局所でも発現上昇がみられた miRNA-146b(Watanabe et al.Br J ophthalmol 100:425-31, 2016) は LPS 刺激による Toll-like receptor 4 (TLR4)を介したシグナル経路を抑制する作用があることが知られている(Curtale al.Proc Natl Acad Sci USA 110:11499-504, 2013)。また EAU で発現の低下がみられた miRNA-124(Watanabe et al.Br J ophthalmol 100:425-31, 2016)も抗炎症作用を有する M2 マクロファージへの誘導効果を有することが報告されていることから(Veremeyko et al. PLoS One 8:e81774, 2013)、病態の異なる 2 つのぶどう膜炎のモデルにおいて共通の miRNA がぶどう膜炎の病態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)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T. Efficacy of Infliximab for Early Remission Induction in Refractory Uveoretinitis Associated with Behçet Disease: A 2-year Follow-up Study.Ocul Immunol Inflamm. 25:46-51, 2017. doi: 10.1080/09273948.2016.1239746.(査読あり)
2. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Yan K, Okada AA. Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary referral centre in Tokyo. Br J Ophthalmol. 101:406-410, 2017. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308194. (査読あり)
3. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Echizen N, Inoue M, Takayama N, Nagane M. Spectral-domain Optical Coherence Tomography Patterns in Intraocular Lymphoma. Ocul Immunol Inflamm. 24:268-73, 2016. doi: 10.3109/09273948.2014.1002568. (査読あり)
4. Watanabe T, Keino H, Kudo A, Sato Y, Okada AA. MicroRNAs in retina during development of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Br J Ophthalmol. 100:425-431, 2016. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-30692. (査読あり)
5. 渡邊交世、慶野博、宮東昭彦¹、佐藤泰彦²、岡田アナベルあやめ. 外国誌要覧 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎における眼局所のmicroRNAの発現. 日本眼科学会雑誌. 120:465,2016. doi:なし. (査読なし)
6. 渡邊交世、慶野博:眼の細菌感染, 結核性眼炎症疾患.眼科. 58:143-150,2016. (査読なし)
7. 渡邊交世:虹彩毛様体炎の臨床, 糖尿病虹彩炎.眼科. 57:809-813,2015. (査読なし)
8. 渡邊交世、岡田アナベルあやめ:リウマチ性疾患の症候学、ぶどう膜炎.分子リウマチ治療.8:32-35,2015. (査読なし)
9. Inokawa S, Watanabe T, Keino H, Sato Y, Hirakata A, Okada AA, Fukuda K, Fukushima A, Umezawa K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- B inhibitor, reduces chemokines and adhesion molecule expression induced by IL-1 in human corneal fibroblasts. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 253:557-563,2015. doi: 10.1007/s00417-014-2879-9. (査読あり)

10. Keino H, Watanabe T, Sato Y, Shudo K, Kitaoka Y, Harada T, Okada AA. Retinoic acid receptor stimulation ameliorates experimental autoimmune optic neuritis. Clin Experiment Ophthalmol. 43:558-567, 2015. doi: 10.1111/ceo.12308. (査読あり)
11. 肥留川京子、慶野博、渡邊交世、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効したSLE網膜症の1例 (原著論文/症例報告) あたらしい眼科 32:904-908, 2015. doi:なし(査読あり)
12. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Taki W. Long-term efficacy of infliximab on background vascular leakage in patients with Behçet's disease. Eye (Lond). 28:1100-6, 2014. doi: 10.1038/eye.2014.138. (査読あり)
- [学会発表](計 18 件)
1. 中山真紀子、慶野博、渡邊交世、岡田アナベルあやめ: AZOOR における眼底自発蛍光の検討. 第 70 回日本臨床眼科学会, 京都, 2016 年 11 月 3 日-11 月 6 日.
2. Nakayama M, Keino K, Watanabe T, Okada AA: Clinical features and visual outcomes of patients with acute new-onset Vogt-Koyanagi-Harada disease at a tertiary center in Tokyo. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.
3. Keino H, Okada AA, Watanabe T, Nakayama M: Maintained remission of uveoretinitis associated with Behçet's disease after discontinuation of successful infliximab therapy. International Uveitis Society Group (IUSG), Dublin, Ireland, April 18th-21th, 2016.
4. 慶野博, 中山真紀子, 厚東隆, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ: レーザースペックル法にて視神経乳頭部血流を観察できた急性網膜壊死の 1 例. 第 33 回日本眼循環学会, 福岡, 2016 年 7 月 22 日-7 月 24 日.
5. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ 原田病初発例 123 例の臨床経過の検討. 第 50 回日本眼炎症学会, 東京, 2016 年 7 月 2 日-7 月 3 日.
6. Keino H, Nakayama N, Watanabe T, Koto T, Okada AA: Compromised optic nerve head blood flow in acute retinal necrosis. ARVO Imaging Conference, Seattle, USA. April 30th, 2016.
7. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 福岡利仁, 駒形嘉紀, 有村義宏, 岡田アナベルあやめ: ベーチェットぶどう膜網膜炎におけるインフリキシマブ中止後の眼炎症活動性の評価. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016 年 4 月 7 日-4 月 10 日.
8. 慶野博, 中山真紀子, 渡邊交世, 中村友子, 岡田アナベルあやめ: 原田病初発例における中心窩下脈絡膜厚の長期経過. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015 年 10 月 23 日-10 月 25 日.
9. 中山真紀子, 山本亜希子, 慶野博, 渡邊交世, 中村友子, 眞鍋歩, 岡田アナベルあやめ: 点状脈絡膜内層症の臨床的特徴および予後. 第 69 回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2015 年 10 月 23 日-10 月 25 日.
10. 津田麻祐子, 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 岡田アナベルあやめ, 平形明人: サイトメガロウィルス網膜炎の発症を機に HIV 陽性と診断された 2 症例. 第 58 回東京多摩地区眼科集談会, 三鷹市, 2015 年 10 月 17 日

11. Keino H, Watanabe T, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA : Efficacy of infliximab for early remission induction in refractory uveoretinitis associated with Behcet 's disease. Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
12. Watanabe T, Keino H, Taki W, Nakayama M, Nakamura T, Okada AA : Clinical features of uveitis in children and adolescents at a tertiary center in Tokyo. Congress of the International Ocular Inflammation Society, Third International Assembly of Ocular Inflammation Societies, San Francisco, USA, September 25th-27th, 2015.
13. 中山真紀子, 慶野博, 渡邊交世, 井上真, 岡田アナベルあやめ:硝子体手術後に発症した ANCA 陽性強膜炎の1例. 第49回日本眼炎症学会, 大阪, 2015年7月10日-7月12日.
14. 中村友子, 慶野博, 眞鍋歩, 中山真紀子, 渡邊交世, 林篤志, 岡田アナベルあやめ:妊娠16週に発症しトリアムシノロンアセトニドテノン嚢下注射で治療した原田病の1例. 第49回日本眼炎症学会, 大阪, 2015年7月10日-7月12日.
15. 慶野博, 渡邊交世, 中山真紀子, 岡田アナベルあやめ:罹病期間別でみたインフリキシマブ導入後のベーチェット病ぶどう膜炎の活動性評価. 第119回日本眼科学会総会, 札幌市, 2015年4月16日-19日.
16. 渡邊交世, 柳沼重晴, 松木奈央子, 永本敏之:網膜色素変性症の白内障手術におけるチン小帯脆弱. 第68回日本臨床眼

科学会、神戸、2014年11月13-16日.

17. 渡邊交世, 肥留川京子, 慶野博, 瀧和歌子, 越前成旭, 岡田アナベルあやめ:糖尿病虹彩炎を発症した患者の臨床的特徴についての検討. 第48回日本眼炎症学会, 東京, 2014年7月4日.
18. Watanabe T, Keino H, Taki W, Echizen N, Okada AA: Efficacy of infliximab in two young patients with Behcet 's disease. World Ophthalmology Congress® of the international council of ophthalmology, Tokyo, April 2nd-6th, 2014.

〔図書〕(計1件)

1. 渡邊交世:梅毒、結核. 眼科疾患 最新の治療 2016-2018. 東京, 南江堂, 2016. P253-254.

〔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

研究者番号:
 (2)研究分担者 ()

研究者番号:
 (3)連携研究者 ()

研究者番号:
 (4)研究協力者 ()