

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861469

研究課題名(和文) 眼内増殖性疾患における硝子体液中のmicroRNAの発現解析とその機能解析

研究課題名(英文) Investigation of microRNA expression and function in vitreous of proliferative vitreoretinal diseases.

研究代表者

大内 亜由美(Ouchi, Ayumi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80645664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性かつ主な失明原因疾患である増殖糖尿病網膜症(PDR)や増殖硝子体網膜症の線維増殖病態を解明することを目的とし、創薬のターゲットとして期待されるmicroRNAに着目し解析した。PDR硝子体中にはmicroRNA-21(miR-21)が増殖病態特異的に発現上昇していた。また、ヒト網膜色素上皮細胞株において、線維増殖反応に重要な上皮間葉系移行過程にてmiR-21の発現が誘導され、糖尿病条件下ではさらに発現上昇が促進した。機能解析においてmiR-21は網膜色素上皮細胞の増殖遊走能に関与していることを明らかにした。これらから、miR-21がPDRの線維増殖病態に関与する新たな可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We focused on microRNAs that are expected as targets of a novel drug with the aim of elucidating the fibroproliferative pathology of proliferative diabetic retinopathy (PDR) or proliferative vitreoretinopathy, which is a main cause of blindness. MicroRNA-21 (miR-21) increased in vitreous of PDR, and its expression was elevated in a fibroproliferative pathology-specific manner. In retinal pigment epithelial cell line, the expression of miR-21 was induced in the epithelial-mesenchymal transition process, which is also important for retinal fibroproliferation, and its expression elevation was promoted under diabetic conditions. On functional analysis, it was revealed that miR-21 promote the proliferation and the migration of retinal pigmented epithelial cells. From these results, we found a new possibility that miR-21 is involved in the pathogenesis of fibroproliferation in PDR.

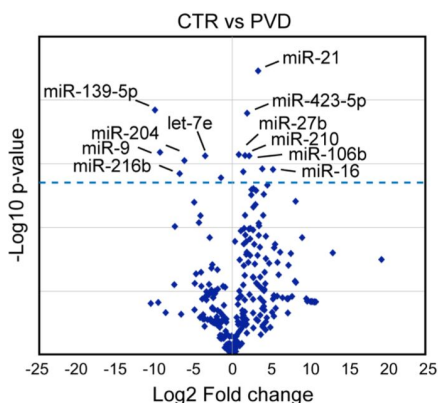
研究分野：眼科学

キーワード：増殖糖尿病網膜症 増殖硝子体網膜症 マイクロRNA 上皮間葉系移行

1. 研究開始当初の背景

眼内増殖性疾患には、増殖硝子体網膜症や増殖糖尿病網膜症(以下 PDR)などがあり、眼内で産生が亢進する様々な生理活性物質の働きにより線維化がおり、線維性の増殖膜が網膜硝子体界面に形成され、その癒痕・収縮により、牽引性網膜剥離を引き起こす疾患である。眼内増殖性疾患は、網膜硝子体手術の飛躍的な発展を遂げた現代においても、難治的で重篤な視機能障害を生じ、視機能低下のリスクが高い疾患である。眼内に線維化を生ずるメカニズムは少しずつ解明されつつあるものの、いまだ不完全であり、それを制御する手段は現在確立されていない。

microRNA(以下 miRNA)は約 20 塩基長からなる低分子 RNA であり、主に標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合しタンパク質産生を抑制し、多様な生命現象において重要な役割を担っている。また miRNA は、様々な臓器の癌や線維化などを含む疾患の病態に関与していることが明らかになっており、創薬ターゲットや診断バイオマーカーとして注目を集めている。さらに miRNA は細胞内だけでなく分泌型 miRNA としてさまざまな体液中に存在し、エクソソームに包埋されるため、熱や酸などに非常に安定した状態で生理活性を持つことが報告されている。眼においては、前房水、硝子体液中にもこの分泌型 miRNA が存在することが報告されはじめています。私たちは、眼内増殖性疾患である牽引性網膜剥離を有する PDR 患者の硝子体液と対照群として黄斑円孔症例の硝子体液を用いて、網羅的に miRNA の発現解析を行った。その結果、一部の miRNA で大きく異なる発現パターンを示すものがあり、その中には線維化に関与すると報告のある miRNA など、興味深い機能の報告があるものが複数含まれていた。



2. 研究の目的

そこで眼内増殖性疾患における硝子体中の miRNA の発現解析と、miRNA の線維増殖膜形成への機能解析を行うことにより、眼内増殖性疾患の病態に関与する miRNA を同定し、その機能解析を行うことにより、眼内増殖性疾患の新たな病態解明と、新しい治療法

の確立を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

学内倫理委員会承認のもと、硝子体手術時に得られる硝子体液を研究に用いた。活動性の高い線維増殖膜を有する増殖糖尿病網膜症患者と黄斑円孔患者の硝子体液中の miRNA を TaqMan® Array MiRNA Cards を用いて網羅的に解析し、その結果より、眼内増殖疾患硝子体中で特異的な発現パターンを示す候補 miRNA を見出した。候補 miRNA に関して、増殖性網膜疾患と非増殖性網膜疾患患者それぞれの硝子体中において Taqman® PCR にて発現レベルを解析し、線維増殖病態特異的な miRNA を抽出した。

in vitro にて、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) などを用いた上皮間葉系移行(以下 EMT)のモデルにおいて、候補 miRNA の発現レベルの変化、および糖尿病条件を模倣した高グルコース培地での発現レベル変化を Taqman® PCR にて検討した。

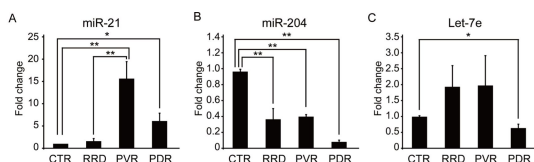
網羅的解析で抽出した候補 miRNA に関して機能解析を行うため、miRNA mimic または inhibitor を用いて gain-of-function および loss-of-function アッセイにおいて、EMT への影響を免疫染色、PCR、ウエスタンブロットにて検討を行い、増殖遊走能への影響を scratch assay, CCK-8 assay などで検討した。

候補 miRNA と糖尿病網膜症病態の首座となる網膜微小血管炎症との関与を検討するため培養ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMEC) を用いて、候補 miRNA の発現および機能を検討した。

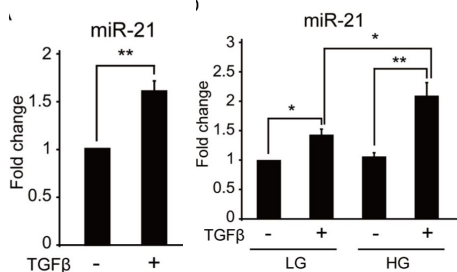
4. 研究成果

活動性の高い線維増殖組織を有する PDR の硝子体液は黄斑円孔の硝子体液と比較し、23 個の miRNA が一貫して有意に発現上昇しており、12 個の miRNA が一貫して有意な発現低下を認めた。本解析結果と PDR 増殖膜における遺伝子発現の相関を検討するため、NCBI Geo に登録されている PDR 増殖膜のマイクロアレイの解析結果をもとに、活動性のない線維増殖膜(以下 inactive FVM)と活動性の高い線維増殖膜(以下 active FVM)で発現変化のある遺伝子を抽出し、PDR の active FVM で変化が見られた遺伝子群と PDR 硝子体中で変化が見られた miRNA の標的配列の相関関係を DIANA mirExtra を用いて解析すると、PDR active FVM で有意に低下していた遺伝子 100 個中、55 遺伝子が、反対に、PDR の active FVM で有意に発現上昇していた遺伝子と PDR 硝子体中で有意に低下していた miRNA では、100

遺伝子中 55 遺伝子に相関を認めた。これらの解析結果から、PDR 硝子体中で特異的な変化が認められた miRNA は、PDR の active FVM における発現遺伝子と多くが相関関係を有することがわかり、眼内増殖疾患の病態に関連している可能性が示唆された。また、PDR 硝子体中で有意に発現変動する miRNA のうち、線維増殖病態との関連が報告されている miR-21, miR-204, let-7e に着目し、候補 miRNA としてさらに解析を行なった。この候補 miRNA について、裂孔原性網膜剥離（以下 RRD）とそれに続発する増殖硝子体網膜症（以下 PVR）、PDR それぞれの硝子体中の発現レベルをみると、miR-21 のみが、RRD に続発する PVR でも発現上昇を認め、さらに増殖をともしない裂孔原性網膜剥離と比較しても有意な発現レベルの差を認めた。このことから、miR-21 が眼内増殖疾患の線維増殖病態にさらに深く関与する miRNA である可能性が考えられた。

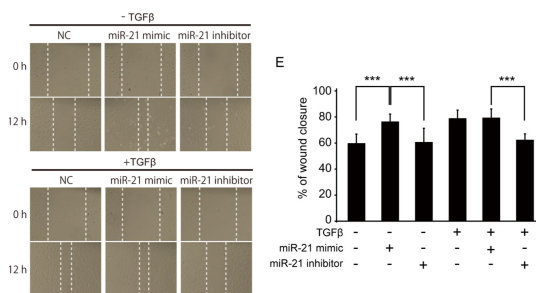


次に、ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 を、増殖性網膜症でも主要な因子であり、強力な線維化作用、色素上皮の形質転換作用のある TGFβ で刺激し、EMT を誘導して候補 miRNA の発現を測定した結果、miR-21 が優位に発現上昇し、miR-204 が優位に発現低下しました。さらに培地を高グルコース濃度にすると TGFβ 誘導 EMT における miR-21 の発現上昇率がさらに促進した。これらから、網膜色素上皮細胞の線維増殖反応の過程において、miR-21 の発現上昇が誘導されることが明らかとなった。



これらの結果から miR-21 に着目し機能解析を行うため miR-21mimic、および miR-21 inhibitor を用いた。これらを用いて、ARPE-19 における miR-21 の過剰発現および発現抑制での、EMT への影響を上皮系マーカーおよび間葉系マーカーとなる遺伝子の発現変化にて検

討したが、明らかな影響は認めなかった。しかし、細胞遊走能に関しては、miR-21 の過剰発現にて亢進し、発現抑制にて低下した。また、miR-21 の発現抑制は TGFβ 誘導による細胞遊走能亢進も抑制することを明らかにした。また、ARPE-19 における細胞増殖能に関して miR-21 過剰発現にて亢進し、miR-21 発現抑制にて低下した。以上より、眼内増殖疾患の病態において、活性化した網膜色素上皮細胞が EMT を起こすと、眼内に miR-21 の発現レベルが上昇し、それが更に色素上皮の遊走能、増殖能亢進に機能することで、線維増殖反応に寄与している可能性が示唆された。



眼内増殖疾患である PDR は微小血管炎症、虚血、線維増殖が病態の首座である。そこでわたしたちは、miR-21 の発現と網膜微小血管炎症の関連についても検討を開始した。HRMEC を用い、miR-21 の発現を測定したところ、高い発現を認めた。また私たちは、Peroxisome Proliferator- Activated Receptor : PPAR のアゴニストとして働く脂質異常症改善薬である fibrate 製剤の一種、ベザフィブラートが糖尿病網膜症における網膜血管内皮細胞の微小血管炎症を抑制する効果を明らかにした。PPAR の中でも特に重要な機能を有する PPAR は miR-21 のターゲットとして知られており、HRMEC において miR-21 inhibitor を transfection すると PPAR の発現レベルが上昇することを見出した。すなわち、miR-21 が糖尿病網膜症における線維増殖メカニズムへの機能のみならず、糖尿病網膜症の初期より病態の首座と考えられる網膜微小血管炎症にも機能している可能性が考えられ、miR-21 をターゲットとしてその発現を抑制することで網膜微小血管炎症と線維増殖の両者を抑制できる可能性が示唆された。今後は、miR-21 阻害剤が眼内増殖疾患の増殖病態や網膜微小血管炎症をコントロールすることで、糖尿病網膜症の進行を予防できるかについて、今後さらなる検討を行う予定である。

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8件)

1. Usui-Ouchi A, Ouchi Y, Kiyokawa M, Sakuma T, Ito R, Ebihara N Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with Development of Proliferative Vitreoretinal Disease. PLoS ONE 2016 11(6): e0158043. doi:10.1371/journal.pone.0158043.
2. Tamaki K, Usui-Ouchi A, Murakami A, Ebihara N. Fibrocytes and fibrovascular membrane formation in proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016 Sep; 57(11):4999-5005. doi:10.1167/iovs.16-19798.
3. 大内亜由美, 清川正敏, 佐久間俊郎, 伊藤玲, 海老原伸行 内科および眼科的未治療の重症増殖糖尿病網膜症の臨床像と手術成績 臨床眼科 69 : 627-633 2015. doi:http://dx.doi.org/10.11477/mf.1410211323
4. 臼井亜由美 眼科医のための先端医療(第159回)網膜細胞分化におけるエピジェネティック機構とmicroRNAの役割(解説)あたらしい眼科 31 : 383-385 2014.
5. 臼井亜由美, 木村至, 清川正敏, 佐久間俊郎, 伊藤玲, 海老原伸行 血管新生緑内障を合併する重症増殖糖尿病網膜症の治療成績と予後不良因子についての検討 眼臨紀 12 : 928-933 2014.

[学会発表](計16件)

1. 大内亜由美, 海老原伸行 網膜血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞におけるベザフィブラートの効果 第120回日本眼科学会総会 宮城, Apr 4-10, 2016. (口頭発表)
2. 大内亜由美, 海老原伸行 ヒト網膜色素上皮細胞株におけるmicroRNA-21の発現と機能解析 第119回日本眼科学会総会 北海道, Apr 16-19, 2015 (ポスター発表)
3. 大内亜由美, 海老原伸行 糖尿病黄斑浮腫に対する抗VEGF硝子体注射への反応不良症例の検討 第69回日本臨床眼科学会 名古屋, Oct 22-25, 2015. (ポスター発表)
4. 臼井亜由美, 玉城和範, 清川正敏, Siti Razila Abdul Razak, 渡辺すみ子 眼内増殖疾患の硝子体中における分泌型microRNAの発現解析 第118回日本眼科学会総会 東京, Apr 2-6, 2014. (口頭発表)

5. 玉城和範, 臼井亜由美, 清川正敏, 佐久間俊郎, 伊藤玲, 海老原伸行 増殖糖尿病網膜症の線維性増殖膜形成における fibrocyte の役割 第118回日本眼科学会総会 東京, Apr 2-6, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内亜由美 (OUCHI, Ayumi)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号 : 80645664