

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06689

研究課題名(和文) microRNAのプロファイリングによる網膜変性疾患治療戦略構築のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for construction of the therapies for retinal degenerative diseases by profiling microRNAs

研究代表者

坂本 謙司 (Sakamoto, Kenji)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80317065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、緑内障や網膜色素変性といった網膜変性疾患における網膜神経細胞死の進行に、microRNAの発現変動が何らかの役割を果たしているとの仮説を立て、一連の研究を行った。緑内障および網膜色素変性モデルマウスの網膜におけるmicroRNAの発現変動を網羅的に解析し、網膜変性疾患において発現が変化しているmicroRNAをいくつか明らかにすることができた。また、これらのmicroRNAの機能をmicroRNA mimicやmicroRNA inhibitorを投与することによって変化させると、網膜神経細胞死の進行を抑制できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、網膜神経変性の発症とmicroRNAの発現変動との間の関係を明らかにすることによって、網膜変性疾患に伴う網膜神経細胞死の発症の鍵となる分子を推測・実証するための基礎を得ることができた。今後、本研究で得られた研究成果は、網膜神経細胞死の発症の鍵となる分子を同定すること、さらには網膜変性疾患に対する神経保護治療法の開発に繋がることが期待される。網膜神経変性疾患に対する神経保護薬の開発は未だ実現していないという現状において、本研究成果の学術的および社会的意義は大であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I hypothesize that the expression changes of microRNAs are at least in part involved in progress of retinal neuronal cell death induced by retinal degenerative diseases, such as glaucoma and retinitis pigmentosa. The expression changes of microRNAs in the retinas of glaucoma model mice and retinitis pigmentosa model mice were comprehensively analyzed. I identified some microRNAs whose expression was upregulated or downregulated in the retinas of these model mice. In addition, I found that the progress of retinal degeneration in these model mice was delayed by treatment with microRNA mimic or inhibitor of such microRNA.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 緑内障 網膜色素変性 microRNA

1. 研究開始当初の背景

私たちは、眼、耳、鼻といった感覚器から視覚、聴覚、嗅覚などの外界の情報を入手して生活しているが、視覚はこの感覚器からの情報の 90%以上を占めていると考えられている。網膜変性疾患は、直接的に生命に危険をもたらさないものの、視覚情報の入手を困難にするため、Quality of Life (QOL) を大きく低下させる原因となる。網膜変性疾患の克服は、世界的にも非常に重要な研究課題の 1 つである。我が国における後天性失明原因の第 1 位は緑内障、第 2 位は糖尿病性網膜症、第 3 位は網膜色素変性である。我が国では社会の高齢化に伴い、緑内障や糖尿病性網膜症といった視機能の障害を引き起こす網膜変性疾患の患者数が増加している。また、網膜色素変性は厚生労働省が定めた特定疾患治療研究事業対象疾患の 1 つである。

緑内障は、眼圧上昇などの原因により視神経が傷害され、その結果視覚障害をきたす疾患であり、そのまま治療せずに放置しておくとも患者は失明する。我が国では、眼圧が正常にもかかわらず、視神経に緑内障に特有の傷害が認められる正常眼圧緑内障の患者が高眼圧緑内障の患者よりも多いことが知られている。現在、有効性が認められている高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障の治療法は、眼圧降下薬や手術による眼圧降下のみであるが、眼圧を十分に下げることができない症例や、眼圧が下がったにもかかわらず視野の狭窄が進行する症例が少なからず存在することから、視神経を直接保護する薬物の開発が切望されている。網膜神経節細胞培養系を用いた *in vitro* の実験系や、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 硝子体内注入モデルをはじめとする実験的緑内障モデル動物を用いた神経保護薬の探索が、主に私や国内外の研究者によって進められている。しかし、明らかな神経保護作用を示す緑内障治療薬は未だ実用化されていない。

網膜色素変性症 (RP) は遺伝病で、厚生労働省が定めた特定疾患治療研究事業対象疾患、いわゆる難病の 1 つであり、進行性の視細胞および網膜色素上皮細胞の変性により視覚障害、ひいては失明を引き起こす疾患である。現在のところ RP による視細胞死を明らかに遅延あるいは停止させる有効な治療法は存在しない。近年、RP 患者に対し iPS 細胞から作製した網膜色素上皮細胞の移植治療の治験が開始されたことが大きな話題となったのは記憶に新しい。また、動物実験レベルにおいては、神経幹細胞を用いた再生医療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療による RP の視覚障害遅延効果が報告されている。しかし、これらは視細胞ではなく網膜色素上皮細胞における遺伝子変異が原因の RP に適用したものであり、あるいはあらかじめ分かっている原因遺伝子の変異をレスキューしたものであり、個々の患者の発症原因遺伝子が不明であることが多い RP の治療に際しては、原因遺伝子によらず視細胞を保護できる薬物の探索も不可欠である。私は、ヒトの常染色体劣性遺伝型 RP において最も多く変異が認められる遺伝子の 1 つであるホスホジエステラーゼ 6 (PDE6) の α サブユニットをコードする PDE6A に変異を持つ RP モデルマウスである *nmf363* を世界で初めて同定した。このマウスモデルは PDE6A の変異に起因する RP の機序解明やその治療法の開発に非常に有用なツールであり、応募者は、本モデルマウス等を活用して、RP により引き起こされる桿体・錐体細胞死の機序解明のための研究を進めているところである。

現在のところ、これらの疾患に随伴する視神経細胞死の機序はほとんど明らかになっておらず、これを抑制できる神経保護薬はいまだ実用化されていない。

2. 研究の目的

microRNA とは、細胞内に存在する長さ 25 塩基程度のノンコーディング RNA であり、種々の遺伝子の発現を抑制することにより、細胞の機能を調節していることが明らかにされている。近年の研究により、microRNA は組織の発生や、がん、感染症、生活習慣病、並びに神経変性疾患の発症・進行にも深く関与している可能性が指摘されているが、網膜変性疾患における microRNA の発現変動については、応募者の知る限り、これまでほとんど報告がない。本研究の目的は、網膜変性疾患の発症に大きく寄与していると考えられる microRNA の機能から網膜変性疾患の発症の鍵となるタンパク質を推測・実証すること、そして、得られた研究成果を網膜変性疾患の新規治療法に応用するための基盤づくりを行うことである。

3. 研究の方法

[1] 各種網膜変性疾患モデル動物における microRNA 発現量の変化
NMDA 硝子体内注入により作製した緑内障モデルマウス、および応募者が同定した *Pde6a* に変異を有する RP モデルマウスである C57BL/6J-*Pde6a*^{*nmf363/nmf363*} において認められる網膜神経細胞死と microRNA との関係性を明らかにするために、これらの疾患モデルマウスの網膜における microRNA の発現変化を microRNA アレイにより網羅的に解析し、正常動物の網膜における発現プロファイルと比較する。マイクロアレイにより得られた結果は定量的リアルタイム PCR により確認する。

NMDA 硝子体内注入により作製した緑内障モデルマウスから NMDA 投与 4~24 時間後に網膜を摘出し、マイクロアレイにより microRNA の発現変動を網羅的に解析する。また、生後 10~25 日の

Pde6a に変異を有する RP モデルマウスである C57BL/6J-*Pde6a*^{nmf363/nmf363} の網膜を摘出し、マイクロアレイにより microRNA の発現変動を網羅的に解析する。発現変動が認められた microRNA の中で、リアルタイム PCR によりその発現変動を確認できたものに関して、以降の実験を行う。

[2] microRNA の機能獲得や機能抑制が緑内障モデル動物の神経網膜に与える影響

microRNA inhibitor と呼ばれる内在性 microRNA の機能を欠失させることができる合成 RNA を用いる。RGC 特異的に ECFP を発現しているトランスジェニックマウスの硝子体内に NMDA を注入することにより緑内障モデルを作製し、このマウスの網膜に、[1]の結果より選定した発現が増加している microRNA の microRNA mimic を導入する。microRNA inhibitor の硝子体内投与 18 時間後に NMDA を硝子体内投与する。その投与 7 日後に眼球を摘出し、固定後、網膜ホルマウント標本作製して共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、網膜神経節細胞に対する純粋な影響を評価する。

[3] microRNA の機能獲得や機能抑制が網膜色素変性モデル動物の神経網膜に与える影響

microRNA mimic あるいは microRNA inhibitor と呼ばれる内在性 microRNA の機能を増幅あるいは欠失させることができる合成 RNA を用いる。生後 15 日の *Pde6a* に変異を有する RP モデルマウスである C57BL/6J-*Pde6a*^{nmf363/nmf363} の網膜下に、[1]の結果より選定した発現が増加している microRNA の microRNA mimic を導入する。投与 10 日後に眼球を摘出し、固定後、パラフィン包埋標本作製する。厚さ 4 μm の組織切片を作製して HE 染色し、光学顕微鏡で観察することにより、視細胞に対する影響を評価する。加えて、固定後、網膜ホルマウント標本作製して Alexa Fluor 488-peanut agglutinin により錐体細胞を標識して、錐体細胞数に対する影響を評価する。逆に網膜変性疾患において発現が減少している microRNA の microRNA inhibitor を導入した際に神経網膜に起きる変化も同様に解析する。

4. 研究成果

[1] 各種網膜変性疾患モデル動物における microRNA 発現量の変化

NMDA 硝子体内注入により作製した緑内障モデルマウスの網膜を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、いくつかの microRNA の発現変動が認められた。リアルタイム PCR で検討したところ、miR-187-5p の発現量は NMDA 投与 8 時間後に、miR-223-3p の発現量は NMDA 投与 12 時間後に、miR-702-3p の発現量は経時的に増加し、NMDA 投与 24 時間後には有意に増加することが明らかとなった。

C57BL/6J-*Pde6a*^{nmf363/nmf363} の網膜を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、いくつかの microRNA の発現変動が認められた。リアルタイム PCR で検討したところ、生後 25 日において、miR-712-3p の発現量は、C57BL/6J と比較して有意に増加しており、miR-7685-3p の発現量は減少する傾向にあることが明らかとなった。

[2] microRNA の機能獲得や機能抑制が緑内障モデル動物の神経網膜に与える影響

miR-187-5p inhibitor および miR-702-3p inhibitor を NMDA 投与 18 時間前に硝子体内投与しておく、NMDA 投与 7 日後における網膜神経傷害が有意に減弱する傾向を示した。miR-223-3p inhibitor を同様に前投与しておく、NMDA 投与 7 日後における網膜神経傷害が減弱した。miR-187-5p inhibitor の前投与は、網膜視神経節細胞層および内網状層において、この microRNA の標的候補の 1 つである TRPC4 のタンパク質の発現量を有意に上昇させた。従って、miR-187-5p inhibitor の NMDA 誘発網膜神経傷害抑制作用には、TRPC4 の発現増加が関与している可能性があるが、今後のさらなる検討が必要である。

[3] microRNA の機能獲得や機能抑制が網膜色素変性モデル動物の神経網膜に与える影響

生後 15 日の C57BL/6J-*Pde6a*^{nmf363/nmf363} マウスに miR-712-3p inhibitor や miR-7685-3p mimic を網膜下投与すると、生後 25 日における明順応下網膜電図の振幅および錐体細胞数の減少が、対照眼と比較して有意

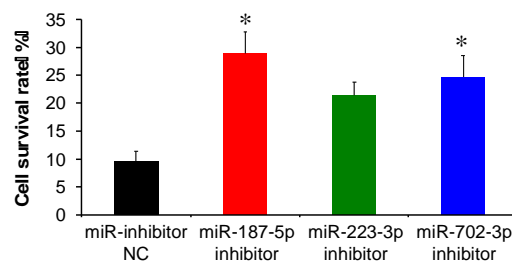


Figure 1 miR-187-5p inhibitor, miR-223-3p inhibitor, および miR-702-3p inhibitor の NMDA 誘発網膜神経傷害に対する保護効果
miR-187-5p inhibitor および miR-702-3p inhibitor 投与群において、RGC 残存率は NC 群と比較して有意に増加し、miR-223-3p inhibitor 投与群においては増加傾向を示した。* $p < 0.05$ vs. miR-inhibitor NC, $n = 5-7$.

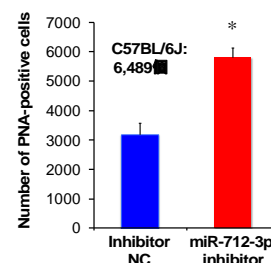


Figure 2 miR-712-3p inhibitor による錐体細胞脱落の抑制
miR-712-3p inhibitor は C57BL/6J-*Pde6a*^{nmf363/nmf363} で観察される錐体細胞の脱落を有意に抑制した。* $p < 0.05$ vs. NC, $n = 4-6$.

に抑制された。従って、*nrf363*における錐体細胞障害の進行には、miR-712-3pの発現量増加やmiR-7685-3pの発現量減少が関与していることが示唆された。今後、miR-712-3pやmiR-7685-3pの標的遺伝子を同定できれば、網膜色素変性において認められる視細胞の脱落に関与している因子を明らかにすることができる可能性があると考えられる。

本研究の結果は、miRNAの発現を制御することにより、網膜変性疾患により引き起こされる視野狭窄の進行を抑制できる可能性に加えて、miRNAの発現変動から網膜変性に関与している因子を明らかにすることができる可能性を示唆している。

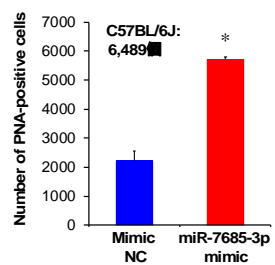


Figure 3 miR-7685-3p mimicによる錐体細胞脱落の抑制
miR-7685-3p inhibitorはC57BL/6J-*Pde6a^{nrf363/nrf363}*で観察される錐体細胞の脱落を有意に抑制した。* $p < 0.05$ vs. NC, n=6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 坂本謙司, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努	4. 巻 155
2. 論文標題 網膜変性疾患におけるmicroRNAの発現変動	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 81-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.19121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakano A, Kondo R, Kaneko Y, Arima S, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Nakahara T.	4. 巻 379
2. 論文標題 Changes in components of the neurovascular unit in the retina in a rat model of retinopathy of prematurity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 473-486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03112-9	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 Mori A, Takeda K, Sakamoto K, Nakahara T.	4. 巻 393
2. 論文標題 Activation of transient receptor potential vanilloid 4 channels dilates rat retinal arterioles through nitric oxide- and BKCa channel-dependent mechanisms in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00210-019-01707-1	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 Nakano A, Mori A, Arima S, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Nakahara T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Attenuation of Retinal Endothelial Vasodilator Function in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 1360-1368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1641825	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 Someya E, Akagawa M, Mori A, Morita A, Yui N, Asano D, Sakamoto K, Nakahara T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of Neuron-Glia Signaling in Regulation of Retinal Vascular Tone in Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20081952	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 Asano D, Morita A, Mori A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T.	4. 巻 182
2. 論文標題 Involvement of matrix metalloproteinases in capillary degeneration following NMDA-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Eye Res.	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.03.005	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 Sakamoto Kenji, Inukai Miho, Mori Asami, Nakahara Tsutomu	4. 巻 177
2. 論文標題 Brilliant Blue G protects against photoreceptor injury in a murine endotoxin-induced uveitis model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 45 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.07.028	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 Sakamoto Kenji, Mori Asami, Ishii Kunio, Nakahara Tsutomu	4. 巻 152
2. 論文標題 Selective neuronal cell death in retinal degenerative diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 58 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.152.58	査読の有無 無
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 Sakamoto Kenji, Suzuki Taishi, Takahashi Kosuke, Koguchi Takumi, Hirayama Tasuku, Mori Asami, Nakahara Tsutomu, Nagasawa Hideko, Ishii Kunio	4. 巻 171
2. 論文標題 Iron-chelating agents attenuate NMDA-Induced neuronal injury via reduction of oxidative stress in the rat retina	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 30 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.03.008	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂本謙司, 萩野谷優紀, 酒井広輝, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 マウスにおいてtumor necrosis factor は酸化ストレスの軽減を介して興奮毒性により誘発される網膜神経節細胞死を抑制する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本謙司, 大川祐依, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 マウス網膜におけるmiR-205の発現変動とNMDA誘発網膜神経節細胞傷害との関係
3. 学会等名 第141回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本謙司, 萩野谷優紀, 酒井広輝, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 Tumor necrosis factor- のマウスNMDA誘発網膜神経節細胞傷害に対する保護作用
3. 学会等名 第39回日本眼薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本謙司, 石原陽平, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 各種麻酔薬がマウスNMDA誘発網膜神経節細胞傷害に与える影響
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本謙司, 石原陽平, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 マウスNMDA誘発網膜神経節細胞傷害作製時に使用する麻酔薬に関する研究
3. 学会等名 第4回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本謙司, 中澤 美奈子, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 カルノシン酸のマウスNMDA誘発網膜神経傷害に対する保護作用
3. 学会等名 第38回日本眼薬理学会(長崎)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本謙司, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 microRNAの制御を介した網膜変性疾患の進行抑制
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本謙司, 中澤 美奈子, 浅野大樹, 森田茜, 森麻美, 中原努
2. 発表標題 カルノシン酸は酸化ストレスを軽減することによりマウスNMDA誘発網膜神経節細胞傷害を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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