

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11489

研究課題名(和文) microRNAを用いた自己免疫性ぶどう膜炎の炎症制御と神経保護作用

研究課題名(英文) The role of microRNA in immune regulation and neuro-protection of autoimmune uveoretinitis

研究代表者

渡邊 交世 (Watanabe, Takayo)

杏林大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90458901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、microRNA (miRNA)が標的mRNAの発現を制御することで免疫・炎症の病態に作用することが明らかとなってきた。本研究ではimmune-regulatory miRNAとして知られるmiRNA-124を眼内に投与することで自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)に対して炎症抑制効果がみられること、EAUを発症したラット血清中のmiRNAの発現について網羅的に検討したところmiRNA-146に代表される炎症抑制に関与するmiRNAが免疫前に比較して発現が上昇していることが確認された。これらの結果からmiRNAがぶどう膜炎の病態の形成に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

以前に我々はEAUの眼局所におけるmiRNAの発現について報告したが、今回の研究から、immune-regulatory miRNAとして知られるmiRNA-146が眼局所に加えて全身的にもEAUの炎症抑制に関与している可能性が示唆された。本研究課題におけるmiRNAを介したEAUに対する炎症制御・神経保護作用の解析、および血液中のmiRNAの網羅的発現解析を通じて難治性ぶどう膜炎に対する新規治療標的分子の同定、miRNAを用いた新たな疾患活動性バイオマーカーの確立へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：microRNAs (miRNAs) are small, noncoding, and regulatory RNAs and regulate gene expression through repression of the expression of target genes. Our previous study revealed that the expression of miRNA -223, 142, and 146 in retina was elevated, whereas the expression of miRNA-181, 183, 124, and 331 was decreased during development of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). The present study demonstrated that intravitreal injection of miRNA-124 significantly reduced the pathological score of EAU in rats. Furthermore, we investigated the changes of miRNA expression in serum during the development of EAU. Microarray analysis demonstrated that the expression of miRNA-3544 and 146a was increased, whereas the expression of miRNA-100 and 130a was reduced on day 14 after immunization. These findings were confirmed by quantitative PCR method. These results suggest that the up-regulated or down-regulated miRNA in serum may play regulatory roles for development and regulation of EAU.

研究分野：眼炎症

キーワード：眼炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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 (Cell 136:215-33, 2009, Nat Rev Mol Cell Biol 15:509-24, 2014)。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 (Shock. 46:122-31, 2016)。

近年、Toll like receptor (TLR) を中心とした自然免疫系を促進、または抑制するいくつかの miRNA が報告されていることから、申請者は EAU の発症前期 (免疫後 7 日目)、炎症極期 (免疫後 14 日目)、炎症消退期 (免疫後 21 日目) の各病期における網膜の miRNA の発現について 680 個のプロープを搭載した microRNA array を用いて網羅的な解析を行った。その結果、免疫直前と比較して miRNA の発現が上昇 (2 倍以上) した miRNA は免疫後 7、14、21 日目でそれぞれ 0 個、9 個、9 個、一方で低下 (1/2 以下) した miRNA は 0 個、4 個、0 個であった。炎症極期となる免疫後 14 日目では miRNA-223、miRNA-142-5p、miRNA-21、miRNA-146a などの miRNA の発現上昇がみられた。さらに In site hybridization 法 (ISH 法) にて miRNA-223、miRNA-146a の局在を検討したところ、炎症極期の眼内に浸潤した炎症細胞において強い発現がみられることを確認した。一方で免疫後 14 日目では miRNA-181、miRNA-183、miRNA-124 などの miRNA の発現低下がみられることを報告した (Watanabe T et al. Br J Ophthalmol. 100:425-31, 2016)。

2. 研究の目的

本研究課題では EAU の炎症極期の網膜において発現の変動がみられた miRNA の中で免疫調節作用を有する miRNA として知られる miRNA-124 の抗炎症効果、神経保護効果を評価するため、miRNA-124 を硝子体内に投与し、EAU の軽症化が得られるか検討した。また EAU を発症したラットの全身における miRNA の動態を明らかにするため EAU 発症前、炎症極期、炎症消退期における血清中の miRNA の発現を gene miRNA 4.0 assay を用いて検討を行った。

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 に混和した乳液をルイ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

免疫当日 (免疫直前)、免疫後 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を評価した。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) miRNA-124 の硝子体内投与による EAU の発症抑制効果の検討

miRNA-124-3p siMature (Koken 社より購入) を細胞内導入試薬である AteloGene (Koken 社) と混合、3.5 ug/5 ul の濃度に調整し、硝子体内に投与 (miRNA-124 群)。対照として non-specific miRNA を合成し、AteloGene と混合したものを硝子体内に投与 (control miRNA 群)、硝子体内投与を行わない群 (無処置群) の 3 群に分類した。上記投与量は既報 (Ito et al. Ophthalmologica DOI:10.1159/000354092) を参考に算出した。上記試薬を EAU 発症初期である免疫後 11 日目に硝子体内に投与、免疫後 17 日目に屠殺して眼球を摘出、病理組織標本を作成し病理組織スコアを測定した。既報 (Okada et al. Ocul Immunol Inflamm. 6:215-226, 1998) を参考に病理組織のスコアリングを行った。

(4) 血清採取、RNA の抽出、miRNA マイクロアレイ解析

免疫当日 (免疫直前)、免疫後 7 日目 (発症前)、14 日目 (炎症極期)、21 日目 (炎症消退期) で血清を採取しトータル RNA を抽出、gene miRNA 4.0 assay による網羅的な発現解析を行った。

(5) 定量 PCR による血清中 microRNA の発現解析

4) において発現の上昇、低下のみられた microRNA について miRNA card を用いた定量 PCR 法 (Applied Biosystems 社、TaqMan® MicroRNA Assay) を用いて発現の確認を行った。

4. 研究成果

(1) miRNA-124の硝子体投与によるEAUの抑制効果の検討

硝子体投与を施行していない無処置群、EAU発症初期である免疫後11日目にnon-specific miRNAを硝子体内投与した群(control miRNA群)、およびmiRNA-124-3pを硝子体内投与した群(miRNA-124群)の3群において免疫後17日目に屠殺して眼球を摘出、病理組織標本を作成した。その結果、無処置群、およびcontrol miRNA群では前房中や虹彩・毛様体、硝子体、網膜内に炎症細胞の著名な浸潤を認め、網膜視細胞層および網膜外顆粒層が広範囲に破壊されていた。一方、miRNA-124投与群においても炎症細胞の浸潤や網膜外層の破壊は観察されるものの、上記2群と比較して軽度であった。病理組織スコアの結果は、無処置群では 8.8 ± 2.2 、control miRNA群では 10.0 ± 1.0 、miRNA-124群では 5.0 ± 1.4 であり3群間に有意な差がみられた。

(2) Gene chip法を用いたEAU誘導ラットの血清中miRNA発現の経時的な変化の検討

EAUを誘導したラットの発症前(免疫後7日目)、炎症極期(14日目)、消退期(21日目)の各病期における血清中miRNA発現についてGene chip法を用いて網羅的な解析を行ったところ、対照群(抗原接種前)に比較して、1.5倍の上昇がみられたmiRNAが免疫後7日で5分子、14日目で9分子、21日目で9分子、1.5倍以下に低下したmiRNAが10分子、14日目で10分子、21日目で10分子であった。経過中に発現の上昇がみられたmiRNAとしてmiRNA-3544やmiRNA-146a、低下したmiRNAとしてmiRNA-100やmiRNA-130aが含まれていた。EAU炎症極期(14日目)の網膜において高発現を示したmiRNA-146は同日の血清中においても免疫前と比較して2.19倍、消退期(21日目)において1.93倍の上昇を認めた。

(3) 定量PCRを用いたmiRNAの発現解析の検討

EAUを誘導したラットの炎症極期(14日目)における血清中miRNA発現についてmiRNA array cardを用いた検討したところ、3倍以上発現の上昇したmiRNAが19分子、1/3倍以下に低下したmiRNAが43分子であった。またmiRNA-146の発現は免疫後14日目の時点で免疫前と比較して4.1倍の上昇を認めた。

以上の結果から immune-regulatory miRNAとして知られるmiRNA-124を硝子体内に投与することでEAUの軽症化が観察された。これまでの報告ではmiRNA-124はTNF- α やIL-6の産生抑制に関与することが知られていることからmiRNA-124を眼内に投与することで眼局所における炎症性サイトカインの反応を抑制することでEAUの病態の進行を抑制している可能性が示唆された。

また今回、EAUを誘導したラットの血清中のmiRNAの発現変動についてマイクロアレイ、および定量PCRの手法を用いて網羅的に検討したところ、両方の実験系においてmiRNA-146を含めたいくつかのmiRNAの発現変動が共通して確認された。以前に我々はEAUを誘導したラットの網膜においてmiRNA-146が免疫前に比較して高発現を示していることを報告した。miRNA-146はToll-like receptor (TLR)を介した刺激が細胞へ伝わることにより誘導が促進され、TNF受容体関連細胞内転写因子であるTRAF6などを標的とし、炎症抑制に作用するmiRNAとして知られている。今回の研究ではEAUの経過中に全身、特に血清中においてmiRNA-146の発現上昇がみられたことから眼局所だけでなく、血液中のmiRNA-146の発現が上昇することで全身的にもimmune-regulatory miRNAとして機能している可能性が示唆された。

本研究課題におけるmiRNAを介したEAUに対する炎症制御・神経保護作用の解析、および血液中のmiRNAの網羅的発現解析を通じて難治性ぶどう膜炎に対する新規治療標的分子の同定、新たな疾患活動性バイオマーカーの確立へと発展していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe T, Keino H, Nakayama K, Taki W, Echizen N, Okada AA.	4. 巻 103
2. 論文標題 Clinical features of patients with diabetic anterior uveitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2017-311453.	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 Nakayama M, Keino H, Watanabe T, Okada AA.	4. 巻 103
2. 論文標題 Clinical features and visual outcomes of 111 patients with new-onset acute Vogt-Koyanagi-Harada disease treated with pulse intravenous corticosteroids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 274-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2017-311691.	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 Ando Y, Keino H, Nakayama M, Watanabe T, Okada AA	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical Features, Treatment, and Visual Outcomes of Japanese Patients with Posterior Scleritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ocul Immunol Inflamm.	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2019.1574838	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 津田麻祐子、慶野博、中山真紀子、倉井大輔、高橋あずさ、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 CMV網膜炎を発症したGood症候群の1例.
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山真紀子、慶野博、安藤良将、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 超広角眼底撮影による原田病急性期の眼底造影所見の検討.
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayuko Tsuda, Hiroshi Keino, Makiko Nakayama, Takayo Watanabe, and Annabelle A Okada
2. 発表標題 Compromised optic nerve head blood flow in cytomegalovirus retinitis.
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山真紀子、慶野博、安藤良将、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 超広角眼底撮影による原田病急性期の眼底造影所見の検討
3. 学会等名 第51回日本眼炎症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤良将、慶野博、中山真紀子、安藤良将、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 杏林アイセンターにおける後部強膜炎の臨床像の検討
3. 学会等名 第51回日本眼炎症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山真紀子、慶野博、高橋あずさ、津田麻祐子、渡辺交世、岡田アナベルあやめ
2. 発表標題 サイトメガロウイルス網膜炎における視神経乳頭部血流の評価
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017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