

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592036

研究課題名（和文）水晶体におけるマイクロRNAの同定と機能解析および白内障関連遺伝子の解明

研究課題名（英文）Investigation and functional analysis of microRNAs in lens and identification of cataract-related genes

研究代表者

久保 江理（KUBO ERI）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：10262619

研究成果の概要（和文）：水晶体の加齢および白内障発症に関与するマイクロRNA（miRNA）の発現とその機能およびmiRNAの標的遺伝子の予測を行った。とくにmiRNA29a, 29cが、白内障や後発白内障発症に関与する遺伝子の制御を行っている可能性を発見した。

研究成果の概要（英文）：We detected the expression and function of microRNAs (miRNAs) which might play important roles as a regulator in lens aging and cataract development. miRNA29a and miR29c may regulate the expression of related genes with posterior capsule opacity after cataract surgery and cataract development of rat lens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：micro RNA, 水晶体の発達, 白内障

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢白内障は、紫外線・酸化ストレス等が危険因子とされているが、これらは水晶体上皮細胞(LEC)の遺伝子変化を引き起こし、LECの持つ代謝、抗酸化機構・分化に障害が生じ、白内障を発症する。

(2) 近年、蛋白質コード遺伝子の silencing に働く microRNA(miRNA)があり、その RNA 機能は多くの生理過程の制御で基本的な働きを任なうことが明らかにされている。この miRNA は、蛋白質をコードしないが、機能性 RNA として標的蛋白質の主に翻訳レベルにお

いて、様々な遺伝子発現を制御している。

(3) 2006年度以降、ラットやマウス、イモリの水晶体において、この miRNA の存在が報告されており (Karali M et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007; Tsonis PA et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2007)、水晶体の発生・成長・再生に関与している可能性が示唆されている。

(4) 過去に、眼科領域で miRNA の機能解析を行なった報告はなく、白内障に関する miRNA の報告は全くない。水晶体は、LEC の部位に

より細胞周期が異なるきわめて特徴的な器官であり、加齢により水晶体混濁、核の硬化といった白内障変化をきたす。よって、抗加齢医学研究といった側面からも、この白内障研究は大変重要といえる。白内障におけるmiRNAのプロファイルを解明することは、白内障の発症と進展のみならずエイジングにおける多彩な病態を理解し、新たな予防・治療・創薬のためのシーズを開発する上で有用である。

## 2. 研究の目的

(1) ラット水晶体の発生、発達、加齢に伴うmiRNAの発現変化を網羅的に解析し、水晶体の加齢による遺伝子制御機構を網羅的に解明する。

(2) 上記結果より、加齢白内障発症に関与するmiRNAの発現とその機能および標的遺伝子の制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 胎生16日、生後4週、14週の発生、発達段階のSprague Dawley (SD)ラット水晶体におけるmiRNAの発現プロファイル解析をマイクロアレイ法で行った。アレイにはAgilent社Rat miRNA arrayを使用した。アレイ上に351種類のmiRNAがスポットされており、各種miRNAの発現を比較した。

(2) 上記miRNAマイクロアレイの発現結果をリアルタイムPCR法にて確認した。

(3) 遺伝性白内障ラットShumiya Cataract Rat (SCR)の水晶体を用い、1と2で同定したmiRNA群の発現変化をリアルタイムPCR法にて比較した。

(4) miRNAの標的遺伝子の同定をSanger miBase Softwareにより、検索した。

(5) 特定のmiRNAパスウェイの阻害または過剰発現により標的遺伝子の発現変化をプロテインブロット法や免疫組織化学法にて確認した。

(6) 加齢黄斑変性症の原因とされる紫外線(UV)照射によるmiRNA群の発現変化をリアルタイムPCR法にて定量する。

## 4. 研究成果

(1) マイクロアレイの結果より、生後徐々に、

有意に発現が低下または上昇したmiRNAのリストを図1に示した。これらmiRNAが、水晶体の発達、加齢変化に関与していると推測される。

2XDown			
Gene Name	ED16	4W	14W
rno-miR-126	1	0.157	0.010
rno-miR-136	1	0.159	0.010
rno-miR-206	1	0.040	0.010
rno-miR-329	1	0.364	0.047
rno-miR-451	1	0.180	0.039
rno-miR-551b	1	0.397	0.010

2XUP			
Gene Name	ED16	4W	14W
rno-let-7b	1	39.675	121.754
rno-let-7c	1	31.570	82.739
rno-miR-29a	1	16.649	51.422
rno-miR-29c	1	13.614	37.460
rno-miR-204	1	5.999	10.186

図1: 生後2倍以上UpまたはDownしたmiRNAs

(2) 図1に示した、マイクロアレイのmiRNA発現結果を、リアルタイムPCR法にて確認した。その結果、各miRNAのmRNAの発現は、生後同様の変化を示していた。

(3) 遺伝性白内障ラットShumiya Cataract Rat (SCR)の水晶体におけるmiRNA群の発現変化を図2に示す。SCRは生後11週以降明らかな白内障を約60%に発症する遺伝性白内障ラットである。7週齢SCRでも水晶体を

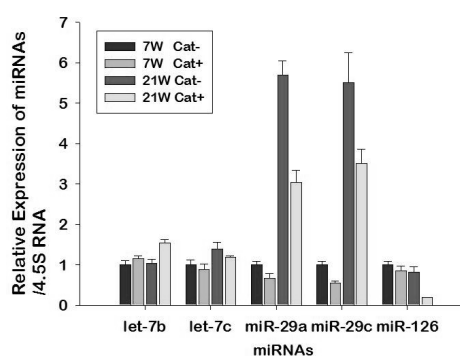


図2: Shumiya Cataract Rat (SCR)のLECにおけるmiRNA発現変化

摘出するとY字縫合の形状より白内障発症を予測可能である。白内障を発症しない水晶体では、let7c, miR29a, 29cは(2)の結果と同様に7から21週齢で発現が上昇する。

白内障を有する水晶体においては、白内障を発症しない群に比べ、これらmiRNAの発現が有意に減少した。またmiR126は、今回加

齢による発現低下は見られなかったが、白内障水晶体において発現が低下していた。よって、これら miRNA の減少が、白内障発症に関連があると推測できる。

(4) 白内障動物モデルである Shumiya Cataract Rat (SCR) をもちいた実験にて、変動がみられた miRNA には、miR29a, 29c, 126, 551b があった。これら miRNA の標的遺伝子を Sanger miBase Software により、抽出した。これら miRNA が制御する遺伝子のうち、白内障や後発白内障に関連するものとして抗酸化蛋白 Peroxiredoxin6 や、細胞骨格蛋白 Tropomyosin, Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ などが標的遺伝子として予測された。

(5) 実際に、これら遺伝子に対する miRNA の制御機構を検討することを目的とし、miRNA パスウェイの抑制を miRIDIAN miRNA mimics のトランスフェクション法を用いて行なった。図3のプロテインブロットの結果にみられるように、miR29a, 29c を抑制すると Tropomyosin 蛋白の発現上昇がみられた。Tropomyosin 発現変化は、白内障動物モデルのSCRの水晶体においても観察された(図3、4)。よって miR29a, 29c は Tropomyosin を翻訳レベルで制御することが分かった。

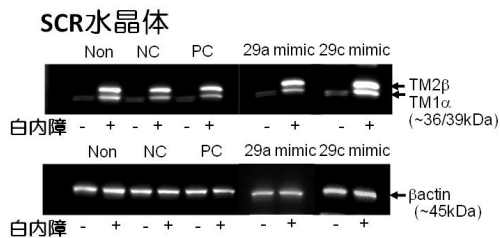


図 3 : miR29a, 29c 阻害(mimics)による Tropomyosin 1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現変化

図4は、免疫組織化学染色法にて、SCR水晶体における Tropomyosin 1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現・局在をみた結果である。Tropomyosin 1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白は、白内障を有しないSCR水晶体のLECの細胞質および表層皮質にわずかに発現している。しかし、白内障を有するSCRの水晶体では、発現量が増加していた。白内障水晶体では Tropomyosin 1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現が上昇していた。これは、プロテインブロット法による定量結果と同様の結果であった。

(6) SCR白内障水晶体をもちい、miR29a,

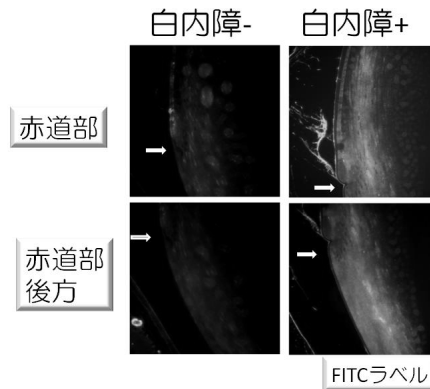


図4 : SCR水晶体における Tropomyosin 1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現・局在

29c 過剰発現(precursor)による TM1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現変化をみました。miR29c を過剰発現すると、TM1 $\alpha$ /2 $\beta$  ともに発現が有意に減少した(図5)。

miR29c を阻害または過剰発現させたこれらの結果より、TM1 $\alpha$ /2 $\beta$  は、miR29c によりコントロールされている可能性があることが確認できた。

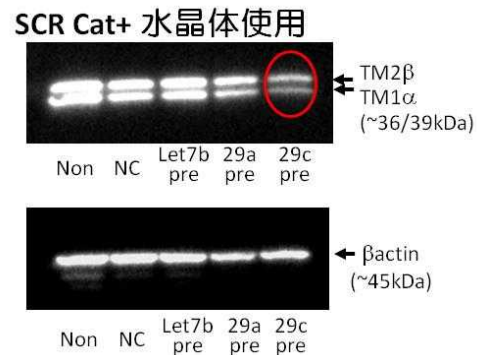


図5 : miR29a, 29c 過剰発現(precursor)による TM1 $\alpha$ /2 $\beta$  蛋白の発現変化

(7) さらに、200-400J/m<sup>2</sup>のUV-Bを培養LECに照射すると、miR29cのmRNA発現が減少し、Tropomyosinの蛋白発現が上昇した。よって、miR29cは、紫外線などのストレスにより、Tropomyosinをはじめとする遺伝子の翻訳制御を行っている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌発表] (計0件)

[学会発表] (計9件)

- ① 久保江理. 白内障原因遺伝子を探そう. シンポジウム 第37回水晶体研究会. 2011. 1. 8-9
- ② 久保江理. 新しい白内障発症の Key Factor: トロポミオシン. シンポジウム. 第49回日本白内障学会総会. 2010. 625-27、大阪.
- ③ Kubo E, Hasanova N, Takamura Y, Singh DP, Akagi Y. Differential expression profiles and role of microRNA in cataractous and non- cataractous lens epithelial cells from SCR rats, and in response to oxidative stress. ARVO 2010 Annual Meeting, 2-6 May 2010, Fort Lauderdale, FL, USA.
- ④ ハサノワナイリヤ, 久保江理, 高村佳弘, 赤木好男. 水晶体の酸化ストレスによる micro RNA 発現変化. 第114回日本眼科学会総会. 2010. 4. 15-18、名古屋.
- ⑤ 久保江理. 水晶体における microRNA の同定と白内障関連遺伝子の解明. シンポジウム. 第114回日本眼科学会総会. 2010. 4. 15-18、名古屋.
- ⑥ Kubo E, Hasanova N, Tanaka Y, Fatma N, Singh DP, Akagi Y. MicroRNA expression profile in the developing, mature and cataractous rat lens. US-Japan CCRG, 6-10 December 2009, Kona, Hawaii, USA.
- ⑦ 久保江理. 白内障発症における microRNA の意義. シンポジウム. 第48回日本白内障学会総会. 2009. 6. 26-28、東京.
- ⑧ Kubo E, Hasanova N, Takamura Y, Singh DP, Akagi Y. MicroRNA expression profiling in developing and mature rat Lens. ARVO 2009 Annual Meeting, 3-7 May 2009, Fort Lauderdale, FL, USA.
- ⑨ 久保江理. 白内障研究 分子生物学的手法. シンポジウム. 第113回日本眼科学会総会. 2009. 4. 16-19、東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 江理 (KUBO ERI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：10262619