

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592063

研究課題名（和文）増殖性網膜症の新規治療法の開発-miRNA を標的とした血管新生抑制

研究課題名（英文）Inhibition of angiogenesis through a targeting miRNA

研究代表者

吉竹 佳の (YOSHITAKE YOSHINO)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00150764

研究成果の概要（和文）：病的な血管新生をする微小血管内皮細胞(HMVEC)がシャーレ内で血管様管腔形成をする際に必要な遺伝子を調べた。最近発見されたマイクロ RNA 遺伝子はタンパクを作る遺伝子の量を調節するのでそれについても調べた。HMVEC を 2.5%の低酸素で培養すると血管新生因子 VEGF が増加し、抑制因子 sFlt-1 が減少した。白内障の原因のひとつである紫外線を水晶体上皮細胞に照射し、その際分泌される因子を調べて白内障との関連を示した。病因に関した遺伝子が発現しないようにする薬の開発に役立つと思う。

研究成果の概要（英文）：When human microvascular endothelial cells (HMVEC), a constituent of microvessels wherein angiogenesis occurs in diseases, formed the capillary like tubes on plastic plate, we found the expression of some specific genes and micro RNA (small non-coding RNA). Hypoxia (2.5%O₂) down-regulated anti-angiogenic factor, sFlt-1 while it up-regulated angiogenic factor, VEGF in HMVEC. UV exposure to human lens epithelial cells stimulated the secretion of several cytokines, which may result in cataract. Our research might be useful for diminishing the actions of causing-disease genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：血管内皮細胞、miRNA、増殖性網膜症、sFlt-1、レンチウイルス、白内障、UVB、水晶体上皮細胞、

1. 研究開始当初の背景

視力障害の原因である網膜血管障害や白内障ではその予防、治療法の改善がQOLの向上には必要と思われる。microRNA(miRNA)は、内在性の non-coding RNA のひとつで標的遺伝子を配列特異的に認識し mRNA の切断または翻訳抑制を行って遺伝子の発現を調節している。増殖性網膜症では虚血網膜での血管内皮細胞の低酸素応答により VEGF/VEGFR2 によるオートクリンループの働きで血管新生が促進され、未熟児網膜症での血管新生は低酸素応答によるエリスロポエチンの誘導に起因することが示されている。大血管内皮細胞(HUVEC)中のmiRNAについては2006と2007年に3報があるのみで、Dicer の siRNA をトランスフェクトして発現を抑制すると in vitro での管腔形成が阻害されると報告されており miRNA は血管新生に必須であることが示されている。遺伝子発現抑制法としてはアンチセンス oligoNT や siRNA を導入するのが一般的である。またウイルスベクターの開発がなされて商業化されておりそれに Dicer や管腔形成に必須の miRNA の発現抑制のための shRNA を導入し、また血管新生抑制因子発現ベクターを用いて動物モデルで増殖性網膜症治療を試みようとした。研究代表者は微小血管内皮細胞 (HMVEC) を用いて in vitro 管腔形成過程での miRNA の発現をクローニング法により検出解析していた。網膜内皮細胞は HUVEC より HMVEC の方に似ていると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 微小血管内皮細胞 (HMVEC) の管腔形成に際し発現する miRNA を明らかにする。増殖や遊走の段階で機能する分子は血管内皮細胞に限らず多くの細胞で共通しているので内皮細胞に特異な管腔形成過程での発現に限局して検索する。

(2) 同時に変動する mRNA を解析して、miRNA の標的分子の特定につなげる。

(3) HMVEC を低酸素培養したときに発現変動する血管新生、あるいは抑制因子を解析し、in vivo での実験に使える抑制因子発現ベクターを構築する。

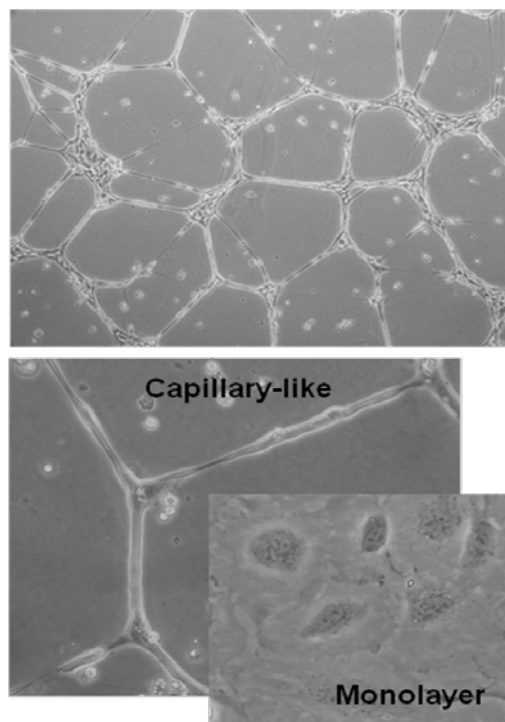
(4) 発現が増加する miRNA や mRNA は管腔形成に必要と考えられるのでそれらの発現が抑制できるレンチウイルスを作成し in vitro で効果を評価する。

(5) マウスで高酸素負荷虚血性網膜症モデルを作成し、その硝子体へ上記の血管新生抑制物を導入して血管新生の阻害効果を検討し治療につなげる。

(6) 白内障の病因のひとつと考えられる UVB 暴露で水晶体上皮細胞で発現上昇する mRNA を探索し、その遺伝子産物の作用を解析して、白内障予防、再発防止の治療法を考える。

3. 研究の方法

(1) ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) の初代培養細胞は Kurabo 社より購入した。HMVEC は Humedia-EB2 に 5% FBS、5ng/ml FGF2、10ug/ml ヘパリン、10ng/ml EGF、1ug/ml hydrocortisone、39.3ug/ml dibutyryl cAMP を添加した培地中で継代した。低酸素培養、増殖実験では 0.1% FBS と 5ng/ml FGF2、10ug/ml ヘパリン添加 EB27 を使用した。継代数 7 代目の細胞を管腔形成にもちいた。株化



血管内皮細胞のマトリゲル上での管腔形成(8h後)

ヒト水晶体上皮細胞(SRA01/04)、ヒト水晶体前囊の初代培養は20% FBS 添加 DME を用いた。UVB 照射は PBS 中で行った。

(2) 管腔形成ではマトリゲル(基底膜成分からなる、増殖因子は除いてある)上へ内皮細胞を播種展開した。その際には 0.5% FBS と 30ng/ml VEGF 添加 EB2 を用いた。比較コントロールとして播種展開前の細胞を 0 時間(0h)試料とした。8 時間後(8h)と 12 時間後(12h)に接着していない細胞を洗浄後、dispase でマトリゲルを消化(37°C、30 分)し、細胞を遠心により回収した。Total RNA は miRNAeasy Mini または RNAeasy Mini kit(Qiagen 社)を用いて抽出精製した。

(3) miRNA マイクロアレイは Agilent 社の Human miRNA Microarray Rel 12.0 システムを用いた。mRNA のマイクロアレイ解析には Affimetrix 社の Human Gene 1.0ST array システムを用いた。miRNA また mRNA の定量的 RT-PCR 解析には TaqMan probe (Applied Biosystems 社)を用い、本研究費補助金により購入したリアルタイム RT-PCR システム StepOne-C (Applied Biosystems 社)を使用した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の管腔形成で発現上昇する miRNA

管腔形成 0h(単層培養)と 8h後のHMVECのRNAよりsmall RNA cloning を行い発現しているmiRNA (miR-21, -126, -24, -17, -23a, let-7a, -16, -27a, -361, -221, -222 等多種)の情報を得ていたため、それらmiRNAの管腔形成 8, 12h後の発現量をRNase protection assayとノーザンブロット解析により単層培養での発現と比較した。let-7aは増加したが、miR-21, -126, -24, -221, -361 は約 30%の減少、他のmiRは変化しなかった。大血管内皮細胞(HUVEC)で高発現が報告されたmiRNAはHMVECでも検出できたが違いもあった(2008 国際学会発表¹²⁾)。管腔形成での発現変動は報告がない。次に約 1000 種見出されているmiRNAの同定と発現量解析を網羅的解析であるmiRNA マイクロアレイを用いておこなった。管腔形成 0h、8h、12h後のRNAを用い、0hより発現が上昇するmiRNA種を調べた。2 回の独立した実験で 8h、12hでの発現の増加を認めた

miR-629*, -135a*, -134, -638, -874 と proangiogenic 活性の報告がある miR-126, let-7f, miR-27b についてリアルタイム RT-PCR で発現量を評価した。結果は miR-135a*, -638 については増加したが、他の分子種についてはその変動は小さかった。proangiogenic な miR については管腔形成では変化を認めなかった。増加した miR の target 遺伝子予測は web 公開ソフトを用いたが、多種にわたり特定はできなかった。本系では proangiogenic な miR の増加がなかったことから、in vitro 管腔形成ステップで 8-12h 後の状態は一般的な angiogenic assay の場合より狭い現象を捉えていると思われる(未発表)。miRNA の target 遺伝子の予測は困難であるので発現 mRNA の解析と合わせて考えることにした。

(2) 血管内皮細胞の管腔形成で発現変動する mRNA

miRNA マイクロアレイに用いたと同じ試料を使用して管腔形成 8h を 0h と比較して mRNA のマイクロアレイ解析をした。表に 8h での発現変化の大きい遺伝子を示した。発現変動

genedescription	symbol	fold change
matrix metalloproteinase 10	MMP10	6.58
Rap guanine nucleotide exchange factor 4 (Epac2)	RAPGEF4	5.90
histone deacetylase 9	HDAC9	5.82
matrix metalloproteinase 1	MMP1	5.17
potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	KCNN2	5.08
HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	HECW2	4.82
endothelin 1	EDN1	0.111
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	GALNTL2	0.156
guanine nucleotide binding protein alpha 14	GNA14	0.209

している遺伝子のネットワーク解析を IPA で行なうと Cell morphology, Organismal injury and abnormalities, Cell signaling 等の機能が浮かんだ。細胞外基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼの MMP-10

と MMP-1、また RAPGEF4、Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4、別名を Exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) 2 についてリアルタイム RT-PCR で発現上昇を確認した。管腔形成では VEGF を添加しているが、上記遺伝子の発現上昇は VEGF 無添加でも起るので、マトリゲル上での HMVEC の展開による細胞外基質からのシグナルの影響を受けた発現上昇と考えられた。また管腔形成でエンドセリン 1 の発現が再現性よく低下したが、結果 1) で増加する miR との関連は不明である。RAPGEF4 は cAMP が結合して不活性型 Rap/GDP を活性型 Rap/GTP にする GEF である。RAPGEF4 (Epac2) は RAPGEF3 (Epac1) と高い相同性を有するが、機能的差異については不明である。Epac1 については大血管内皮細胞 (HUVEC) での発現とその機能についての報告がいくつかある。しかし Epac2 については報告がないので管腔形成時での両者の発現を比較した。HMVEC では Epac1、Epac2 がともに発現しており、Epac2 の発現量は管腔形成 0h、8h でいずれも Epac1 より高かった。Epac2 の発現は VEGF 添加により増強されたが、forskolin 刺激によっても発現増強を認めた。Epac1 については Epac2 ほどの発現上昇は認められず大血管と微小血管内皮細胞の違いを示していると思われた (未発表)。その作用を特定するための薬剤 (IBMX, H89 等) の添加は管腔形成では毒性を示したので培養条件を工夫して解析する必要があると考える。今後は (2) の miRNA の結果と合わせて Epac などの作用を調べて管腔形成抑制法の開発へつなげる。

(3) 低酸素下での血管新生因子関連遺伝子の発現と sFlt-1 による VEGF 作用抑制

虚血性網膜症病態での内皮細胞は低酸素下にある。HMVEC 単層培養での低酸素 (1-5%) 培養では VEGF の発現が上昇したが、同時に VEGF を細胞外でタラップする働きを持つ可溶性 VEGFR1 (sFlt-1) の発現は抑制されることを見出した。その機構は Flt-1 の mRNA が選択的 3' 端プロセッシングを受け膜貫通ドメインを欠いたアイソフォームの産生が減少することによった (2011 発表論文②)。sFlt を発現するレンチウイルスを作成し HMVEC に感染させて、VEGF による増殖を sFlt が抑制することも明らかにした (発表論文②)。従って虚血性網膜症の治療に sFlt 発現レンチウ

イルスの効果を試す準備が整った。またマウスでの in vivo 実験の準備としてマウス E14 胎児の皮膚にレンチウイルスを投与しマーカール GFP の発現を確認した。

(4) UVB による水晶体上皮細胞で発現上昇する遺伝子と白内障発生とその予防

UVB による水晶体混濁の機構解明のため UVB 照射 SRA01/04 細胞の遺伝子発現変化を mRNA マイクロアレイを用いて解析した。約 90% の細胞が生存する UVB 量 $30\text{mJ}/\text{cm}^2$ を照射し、12h、24h 後に RNA を抽出した。12h では多くの遺伝子の発現が抑制されていたが、61 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加していた。24h でも発現上昇している遺伝子と合わせて 94 の発現上昇遺伝子があった。IPA 解析では apoptosis, survival, cellular growth and proliferation 等の機能が浮かんだ。細胞外への分泌蛋白でかつ UVB 照射での報告のない、EGF family の amphiregulin (AREG) と TGF- β superfamily の GDF15 に注目して解析した。両タンパクは UVB 照射で SRA01/04 の培地中へ分泌されていることが ELISA で確認できた。またリコンビナント両タンパクを用いて SRA01/04 の DNA 合成とタンパク合成への効果を調べた結果、AREG は DNA 合成とタンパク合成を促進した。GDF15 はタンパク合成を促進した。白内障術後の水晶体前囊より調製した初代培養細胞についても UVB 照射により両因子の mRNA 発現上昇が確認できた。AREG と GDF15 はオートクリンで水晶体上皮細胞に作用するだけでなく、パラクリン作用により水晶体線維細胞の代謝にも関与し、UVB によるとされる皮質白内障の発症に関与すると考えられた (2011 発表論文⑥)。今後は AREG および GDF15 の shRNA を発現するレンチウイルスを作成し、UV 誘発白内障の予防薬の開発につなげる。

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 10 件)

- ① Yamamoto K, Ueta Y, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Yonekura H, Kato N. An intracellular amyloid- β toxicity is counteracted by expression of Homer1a in neocortex pyramidal cells. J. Neurosci. in press (2011) (査読有)
- ② Ikeda T, Sun L, Tsuruoka N, Ishigaki Y, Yoshitomi Y, Yoshitake Y, Yonekura H.

- Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing.
Biochem. J. **436**, 399-407 (2011) (査読有)
- ③ Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H.
Septic shock is associated with receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ligation of LPS.
J. Immunol. **186**, 3248-57 (2011) (査読有)
- ④ Yaguchi H, Ikeda T, Osada H, Yoshitake Y, Sasaki H, Yonekura H.
Identification of the COL2A1 Mutation in Patients with Type I Stickler Syndrome Using RNA from Freshly Isolated Peripheral White Blood Cells.
Genet. Test. Mol. Biomarkers. **15**, 231-237 (2011) (査読有)
- ⑤ 福田正道、矢口裕基、藤田信之、稲垣伸亮、長田ひろみ、柴田奈央子、佐々木洋。
ヒアルロン酸ナトリウム点眼液の角膜細胞に対する影響の検討。 **新しい眼科** **28**, 549-552 (2011) (査読無)
- ⑥ Yoshitake Y, Osada H, , Ikeda T, Ishigaki Y, Takata T, Tomosugi N, Sasaki H, Yonekura H.
Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells.
Mol. Vis. **17**, 159-169 (2011) (査読有)
- ⑦ Yamashiro Y, Sasaki H, Ibaraki N, Nagai K, Kawakami Y, Yaguchi H, Fujita N, Osada H, Sasaki K.
Cyclin-dependent kinase inhibitor p16 and p21 expression, and cell cycle change in human lens epithelial cell line SRA01/04 following contact inhibition in normal culture.
Ophtal. Res. **46**, 38-43 (2011) (査読有)
- ⑧ Ohe K, Watanabe T, Harada SI, Munesue S, Yamamoto Y, Yonekura H, Yamamoto H.
Regulation of alternative splicing of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through G-rich cis-elements and heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H.
J. Biochem. **147**, 651-659 (2010) (査読有)
- ⑨ Nakajima H, Ishigaki Y, Xia Q, Ikeda T, Yoshitake Y, Yonekura H, Nojima T, Tanaka T, Umehara H, Tomosugi N, Takada T, Shimasaki T, Nakaya N, Sato I, Koizumi K, Kawakami K, Minamoto T, Motoo Y.
Identification of HITS, anewly identified TU3A/DDR1 family of protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation.
Int. J. Oncol. **37**, 583-593 (2010) (査読有)
- ⑩ Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Ohkubo T, Kobayashi Y.
Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction.
Biochemistry **47**, 12299-12311 (2008) (査読有)
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 池田崇之、吉富泰夫、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人
低酸素刺激による微小血管内皮細胞の可溶性 VEGF 受容体 (可溶性 Flt-1) 産生の抑制
第 83 回日本生化学会北陸支部会, 平成 23 年 5 月 28 日, 金沢大学角間キャンパス (金沢市)
- ② Ikeda T, Yoshitomi Y, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H.
Soluble VEGFR-1 production is down-regulated under hypoxia in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving alternative mRNA 3'-end processing.
日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム, 平成 23 年 5 月 25-26 日, 石川県立音楽堂 (金沢市)
- ③ 吉竹佳の、長田ひろみ、池田崇之、石垣靖人、高田尊信、友杉直久、佐々木洋、米倉秀人
UVB 曝露ストレスによる水晶体上皮細胞の Amphiregulin 発現の上昇
第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ④ 池田崇之、吉竹佳の、米倉秀人
低酸素状態は 3'端プロセッシングを制御することによって血管内皮細胞での可溶性 VEGF 受容体 (可溶性 Flt-1) 産生を減少させる
第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑤ 池田崇之、吉竹佳の、米倉秀人
可溶性 VEGF 受容体 (可溶性 Flt-1) 産生を制御する選択的 3'端プロセッシングメカニズムの解明
第 12 回日本 RNA 学会年会, 平成 22 年 7 月 27-29 日, 一橋記念講堂 (東京都)
- ⑥ 長田ひろみ、吉竹佳の、石垣靖人、池田崇

- 之、山代陽子、米倉秀人、佐々木洋
UVB 暴露による培養水晶体上皮細胞での
遺伝子発現変化
第 114 回日本眼科学会総会，平成 22 年 4
月 15 日-18 日，名古屋国際会議場（名古屋
市）
- ⑦ 長田ひろみ、吉竹佳の、石垣靖人、池田崇
之、山代陽子、米倉秀人、佐々木洋
UVB 暴露による培養水晶体上皮細胞での
遺伝子発現変化
第36回水晶体研究会，平成22年1月9-10日，
晴海グランドホテル（東京都）
- ⑧ 米倉秀人、池田崇之、吉竹佳の、矢口裕基、
長田ひろみ、佐々木 洋
患者末梢血白血球 RNA を用いた Stickler
症候群原因遺伝子 COL2A1 の新規 3'splice
site 変異の同定
第 82 回日本生化学会大会，平成 21 年 10
月 21-24 日，神戸ポートアイランド（神戸
市）
- ⑨ 池田崇之、野口直哉、吉川雄朗、宇留野 晃、
那谷耕司、高澤 伸、岡本 宏、米倉秀人、
菅原 明
2 型リアノジン受容体遺伝子には GG-AG
配列で切断されるイントロンが存在する
第 82 回日本生化学会大会，平成 21 年 10
月 21-24 日，神戸ポートアイランド（神戸
市）
- ⑩ Osada H, Yaguchi H, Yoshitake Y, Sasaki
H, Yonekura H.
Identification of the mutation site of Stickler
syndrome causative gene in RNA extracted
from peripheral blood leukocyte.
The Association for Research in Vision and
Ophthalmology, May 3-7 2009, Florida, USA.
- ⑪ 長田ひろみ、矢口裕基、佐々木 洋、孫
立、吉竹佳の、米倉秀人
末梢血白血球 RNA を用いた Stickler 症候群
原因遺伝子の変異部位の同定
第 113 回日本眼科学会総会，平成 21 年 4
月 16 日-19 日，東京国際フォーラム（東京
都）
- ⑫ Yoshitake Y, Yonekura H.
Micro-RNAs expressed in human
microvascular endothelial cells.
The 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB
Conference, June 28-July 3 2008, Athens,
Greek.
- ⑬ Yonekura H, Tsuruoka N, Yoshitake Y, Sun L,
Watanabe T, Yamamoto H.
Regulatory mechanisms of alternative 3'-end
processing of soluble VEGF receptor
pre-mRNA in vascular endothelial cells.
The 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB
Conference, June 28-July 3 2008, Athens,
Greek.
- ⑭ 酒井康夫、鶴岡直樹、吉竹佳の、米倉秀人、

沼田徳暁，
ヒト骨芽細胞のコラーゲン産生およびラ
ットの骨折治癒に対するコラーゲン・トリ
ペプチドの効果。

第 62 回日本栄養食糧学会，平成 20 年 5 月
2-4 日，女子栄養大学坂戸キャンパス（埼
玉県坂戸市）

- ⑮ 矢口裕基，福田正道，高橋信夫，佐々木洋
カルテオロール塩酸塩持続性点眼液の培
養角膜細胞に対する影響
第 112 回日本眼科学会総会，平成 20 年 4
月 17-20 日，パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉竹 佳の (YOSHITAKE YOSHINO)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00150764

(2) 研究分担者

米倉 秀人 (YONEKURA HIDOTO)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80240373

矢口 裕基 (YAGUCHI HIROMOTO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：40410344